

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

EXPRESE A CHARAKTERIZACE PROTEINU PHR2 Z CANDIDA
ALBICANS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ZUZANA VLČKOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

EXPRESE A CHARAKTERIZACE PROTEINU PHR2 Z CANDIDA ALBICANS

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF PHR2 PROTEIN OF CANDIDA ALBICANS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ZUZANA VLČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Kristína Kováčová

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0841/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Zuzana Vičková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Kristína Kováčová	
Konzultanti:	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	

Název bakalářské práce:

Exprese a charakterizace proteinu Phr2 z *Candida albicans*

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Zuzana Vičková
Student(ka)

Ing. Kristína Kováčová
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.

BiochemNet



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Transglykozylázy mají významnou funkci v buněčné stěně kvasinek. Tyto enzymy štěpí molekulu donoru s následným přenesením nově vytvořeného redukujícího konce na neredukující konec molekuly akceptoru. Tím je umožněn růst, rozpínání a tvarování buněčné stěny kvasinek během jejich života. Tato bakalářská práce se zaměřuje na charakteristiku rekombinantního Phr2 proteinu z *Candida albicans* na úrovni její transglykozylační aktivity. Fluorescenční papírovou metodou byly zjištěny optimální podmínky transglykozylační aktivity Phr2 proteinu, tedy pH optimum a teplotní optimum. Stejná metoda byla využita ke stanovení substrátové a donorové specifity Phr2p která potvrdila výsledky experimentů na úrovni genetiky, tj. vysokou donorovou a i akceptorovou specifitu k β -1,3-glukanu. Substrátová specifita byla také měřena pomocí HPLC. Produkty transglykozylační reakce katalyzované Phr2p s laminarinem jako donorem a L5-SR jako akceptorem obsahující fluorescenční značku, byly detekovány pomocí TLC a MALDI-TOF.

ABSTRACT

Transglycosylases have an import function in yeast the cell wall. These enzymes cleave a molecule of donor, which is followed by transferring a newly created reducing end to a non-reducing end of a molecule of an acceptor. This process enables a growth, expansion and shaping of the yeast cell walls during their life. The aim of this Bachelor Thesis is to characterise the role of Phr2 recombinant protein of *Candida albicans* in a transglycosylase activity. Using fluorescent paper method, optimal pH and optimal temperature of transglycosylase activity of Phr2 protein were found. The same method was used to establish the acceptor and donor specificity of Phr2p was performed as another method for substrate specificity measurement. High donor and acceptor specificity of Phr2 protein to β -1,3-glucan was confirmed. HPLC products of transglycosylase reaction catalysed by Phr2p with laminarin as a donor and L5-SR as an acceptor containing a fluorescent marker were detected by TLC and MALDI-TOF.

KLÍČOVÁ SLOVA

buněčná stěna kvasinek, Phr2 protein, transglykozylázy, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*

KEYWORDS

yeast cell wall, Phr2 protein, transglycosylases, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*

VLČKOVÁ, Z. *Expresa a charakterizace proteinu Phr2 z Candida albicans*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 61 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Kristína Kováčová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a plně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kristíně Kováčové za ochotu, pomoc a cenné rady při vytváření této bakalářské práce a také za čas, který mi věnovala při tvorbě experimentální části a následně společným konzultacím během vzniku celé této bakalářské práce. Dále mé poděkování patří doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. a zároveň Ing. Evě Stratilové, Ph.D. a jejímu celému týmu na Chemickém ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě za umožnění odborné stáže a realizaci mé závěreční práce. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině za podporu v průběhu bakalářského studia na Vysokém učení technickém v Brně, Fakultě chemické.

OBSAH

1 ÚVOD	8
1.1 Cíle práce.....	8
1.2 Struktura práce	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Kvasinky	9
2.1.1 <i>Candida albicans</i>	9
2.2 Buněčná stěna kvasinek	10
2.2.1 Složení buněčné stěny kvasinek	10
2.2.1.1 β -1,3-glukan a jeho syntéza	11
2.2.1.2 β -1,6-glukan a jeho syntéza	12
2.2.1.3 Chitin a jeho syntéza	12
2.2.1.4 Proteiny buněčné stěny	13
2.3 Transglykozylázy a transglykozylační mechanismus.....	14
2.3.1 Transglykozylázy kvasinek	15
2.3.1.1 Transglykozylázy rodiny GH 72.....	15
2.3.1.2 Transglykozylázy rodiny GH 16.....	16
2.4 Metody použité v této práci	17
2.4.1 Analytické metody	17
2.4.2 Chromatografické metody	17
2.4.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě	17
2.4.1.3 Afinitní chromatografie	18
2.4.1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	19
2.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	20
2.4.3 Hmotnostní spektrometrie	21
2.4.3.1 MALDI TOF	22
2.4.4 Fluorescenční papírová metoda	23
2.4.5 Dialýza.....	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1 Přístroje a zařízení	25
3.2 Chemikálie.....	25
3.3 Software.....	26
3.4 Pomůcky	26
3.5 Fluorescenční značení oligosacharidů sulforodaminem	27
3.6 Exprese Phr2 proteinu <i>C. albicans</i> v <i>P. pastoris</i>	28
3.6.1 Příprava médií	28
3.6.2 Dialyzační pufr	28
3.6.3 Proces exprese Phr2 proteinu	29
3.6.4 Purifikace rekombinantních proteinů na CHSFF	29

3.7 Elektroforéza SDS-PAGE.....	30
3.8 Testování aktivity Phr2 proteinu	31
3.8.1 pH optimum Phr2p	31
3.8.2 Teplotní optimum Phr2p	32
3.8.3 Substrátová specifita Phr2p	33
3.8.3.1 Testování substrátové specifity pomocí fluorescenční papírové metody ..	33
3.8.3.1 Testování substrátové specifity pomocí metody HPLC.....	34
3.8.4 Donorová specifita Phr2p	34
3.8.5 Závislost aktivity Phr2p na délce řetězce akceptoru	35
3.8.6 Koncentrační závislost aktivity Phr2p.....	35
3.8.7 Teplotní stabilita Phr2p	36
3.9 Analýza produktů transglykozylační reakce katalyzované Phr2p	36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1 Značení oligosacharidů OS-SR	37
4.2 Exprese a purifikace Phr2p	38
4.3 Testování transglykozylační aktivity proteinu Phr2	38
4.3.1 pH optimum Phr2p	39
4.3.2 Teplotní optimum Phr2p	40
4.3.3 Substrátová specifita Phr2p	41
4.3.3.1 Testování substrátové specifity Phr2p papírovou fluorescenční metodou	41
4.3.3.2 Testování substrátové specifity Phr2p pomocí HPLC	41
4.3.4 Donorová specifita Phr2p.....	44
4.3.5 Závislost aktivity Phr2 proteinu na délce řetězce akceptoru	45
4.3.6 Koncentrační závislost Phr2p	45
4.3.7 Teplotní stabilita Phr2p	46
4.3.8 Analýza produktů vzniklých transglykozylační aktivitou Phr2p	47
5 ZÁVĚR	51
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	59

1 ÚVOD

Candida albicans je diploidní houba, kterou můžeme najít v téměř každé části lidského organismu, např. na povrchu sliznice v ústní dutině, trávicí soustavě, urogenitální soustavě, ale může se vyskytovat i na kůži. V závislosti na oslabení hostitele může *Candida albicans* způsobit různé druhy infekcí označovaných jako kandidózy. Tato kvasinka se stala lékařsky významným patogenem u imunokompromitovaných pacientů, tedy u diabetiků, lidí s infekcí HIV/AIDS, pacientů podrobených chemoterapii či transplantaci orgánů a podobných.

Mnoho životně důležitých funkcí kvasinek představuje buněčná stěna, která se skládá ze dvou vrstev, z vnější a vnitřní. Hlavní složkou vnitřní vrstvy buněčné stěny jsou β -1,3-glukan a β -1,6-glukan. β -1,3-glukan je velmi specifický polysacharid, protože se nachází pouze v buněčné stěně kvasinek a hub. Z toho důvodu je považován za unikátní terč pro výzkum a vývoj nových antimykotik, jako je např. kaspofungin, který je účinný proti různým druhům *Candida* či *Aspergillus*.

Virulence udává schopnost mikroorganismů přizpůsobit se podmínkám v různých místech lidského organismu, tedy v místech s různým pH. Tato schopnost přímo souvisí se stavbou vnější vrstvy buněčné stěny, která je tvořena manoproteiny propojenými disulfidickými můstky. Ke katalýze supramolekulárních struktur s kovalentními vazbami slouží transglykozylázy, enzymy nacházející se v buněčné stěně. Jejich potenciální úloha je částečně známa na úrovni molekulové biologie a genetiky, ale jen málo z nich bylo charakterizovaných na úrovni transglykozylační aktivity. Objasnění této aktivity u kvasinek a hub by mohlo pomoci ve vývoji nových antimykotik jako inhibitorů těchto enzymů.

1.1 Cíle práce

Na Chemickém ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě probíhá výzkum s názvem Transglykozylázy rostlinných a fungálních buněk. Tato bakalářská práce navazuje na probíhající zkoumání a jako cíl si klade charakterizaci Phr2 proteinu specifického pro kvasinku *Candida albicans* na úrovni jeho transglykozylační aktivity.

1.2 Struktura práce

Tato bakalářská práce se nejdříve zabývá vysvětlením základních pojmů týkajících se stavby buněčné stěny, transglykozyláz kvasinek a analytických metod používaných k jejich kvantitativní a kvalitativní analýze. V další části práce jsou popsány transglykozylační aktivity Phr2 proteinu. V závěru práce je shrnutí výsledků transglykozylační aktivity Phr2 proteinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které se rozmnožují převážně vegetativním způsobem, tzn. pučením nebo dělením a patří mezi houby (*Fungi*). Vedle vegetativního rozmnožování je však u většiny kvasinek znám i pohlavní způsob rozmnožování. Český název je odvozen podle schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy, některé disacharidy, případně i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Nejčastější tvar buněk kvasinek je krátce elipsoidní, případně vejčitý až kulovitý, může se však také vyskytovat tvar trojúhelníkovitý, válcovitý, citronovitý, vláknitý nebo kosákovitý [1].

Kvasinky jsou v přírodě velmi rozšířeny. Objevují se hlavně na materiálech, které obsahují cukry, tzn. cukernaté potraviny, bobulové a peckovité ovoce, dále v nektarech květů, v půdě, ve vzduchu, na listech rostlin a ve střevním traktu lidí, ale i zvířat a některého hmyzu. Šíří se přenašeči, převážně větrem, hmyzem apod. [1].

Výskyt kvasinek je ovlivněn nízkou tepelnou odolností. Při 2–5 minutovém zahřívání na 56 °C je většina kvasinek usmrcena, při teplotě 38 °C je rozmnožování kvasinek úplně zastaveno, u některých druhů již při teplotách nad 25 °C [1].

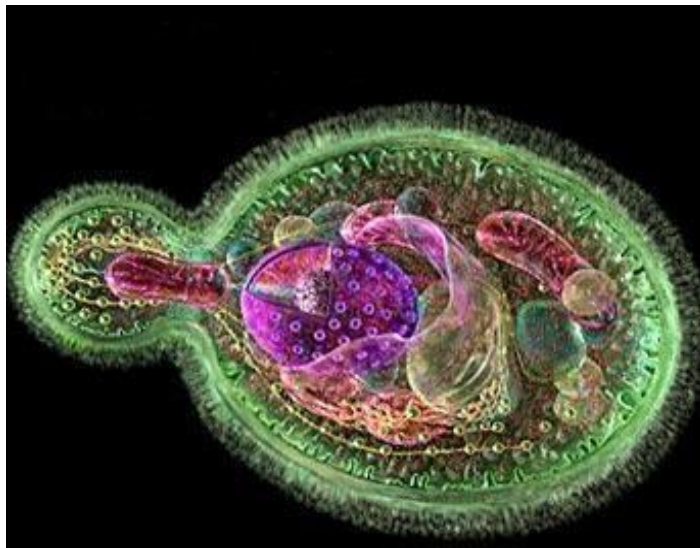
Některé druhy kvasinek jsou patogenní. Tyto kvasinky vyvolávají vážná onemocnění u jedinců s oslabeným organismem nebo při poškození imunitního systému. Mezi nejnebezpečnější druhy patří *Candida albicans* (*C. albicans*), *Cryptococcus neoformans*, rody *Filobasidiella*, *Malassezia* a některé druhy rodu *Trichosporon* [2]. Tyto kvasinky se staly lékařsky významným patogenem u imunokompromitovaných pacientů, např. u diabetiků, lidí s infekcí HIV/AIDS, pacientů podrobených chemoterapii nebo u jedinců s transplantací orgánů. Také mohou být nebezpečné pro lidi, jejichž imunita je narušena léčbou antibiotiky a dalšími rizikovými faktory, které mohou ovlivnit vnitřní rovnováhu organismu [3].

2.1.1 *Candida albicans*

C. albicans (obrázek 1) je diploidní houba, která má pozoruhodnou schopnost růst v několika různých morfologických formách: kvasinky a hýfy, v závislosti na podmínkách prostředí přechází mezi těmito dvěma formami [4]. Je možné ji najít v téměř každé části lidského organismu, např. na povrchu sliznice v ústní dutině, trávicí soustavě, urogenitální soustavě, ale lze ji najít i na kůži. V závislosti na oslabení hostitele *C. albicans* způsobuje různé druhy infekce. Tyto infekce se běžně nazývají kandidózy, což jsou v hovorovém jazyce například afty v sliznici úst [5].

Termín kandidóza se používá pro houbovitě infekce způsobené různými druhy *Candida*, kdy mezi nejběžnější patří kvasinka *C. albicans*. Kandidóza se rozděluje na povrchní a hloubkovou. Povrchní kandidózu najdeme jako infekci na kůži nebo sliznici, například jako vaginální a ústní afty. Nepříjemné lokální záněty však nevedou k vážným onemocněním

a nejsou pro život nebezpečné. Naopak hloubková kandidóza může být letální. Je možné, aby se infekce v organismu přenášela krví, v takovém případě dochází k napadání ledvin, srdce, plic a dokonce i mozku [5]. Morfologické složitosti a to, že je *C. albicans* diploidní, společně s neschopností prokázat pohlavní cyklus, významně narušuje obvyklou genetickou analýzu [6].



Obrázek 1: *Candida albicans* [7]

2.2 Buněčná stěna kvasinek

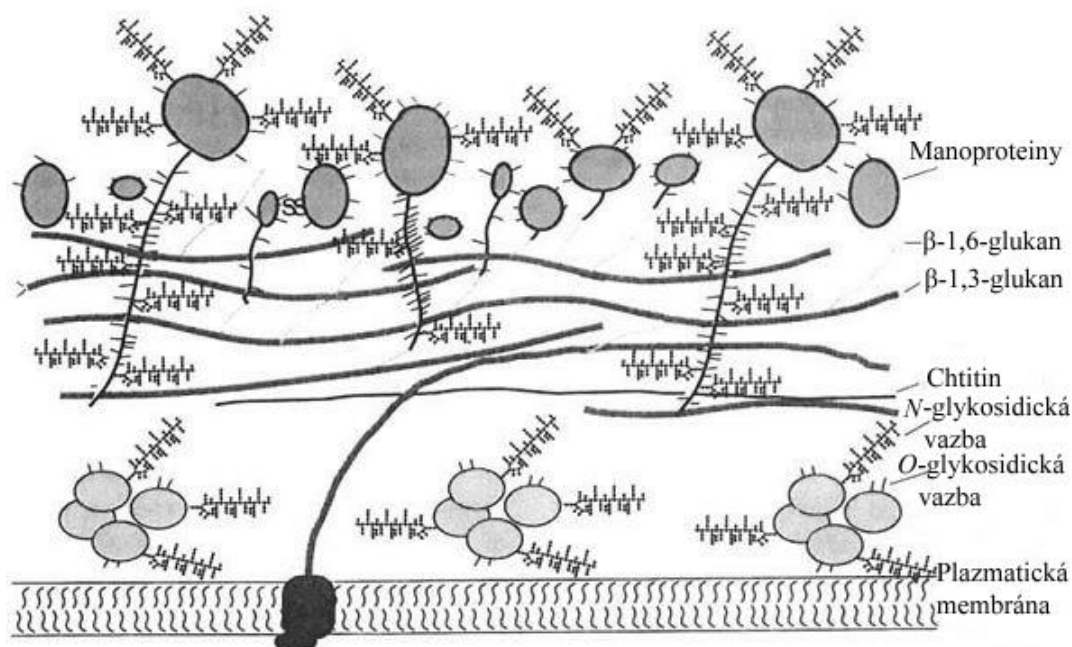
Kvasinky jsou obklopeny buněčnou stěnou, která dává buňce tvar a zajišťuje fyzikální a osmotickou ochranu buňky. Tvoří 15–25 % z celkové hmotnosti sušiny buňky, je významným charakteristickým rysem všech kvasinek a její šířka je 100–200 nm. Buněčná stěna hraje důležitou úlohu při sexuálním rozpoznávání mezi buňkami opačného párovacího typu, sporulaci, flokulaci a odpovědi na stres. Buňky bez buněčné stěny nejsou schopny konjugace, ani cytokineze, proto je buněčná stěna nezbytná pro jejich rozmnožování [8]. Funkce buněčné stěny přímo závisí na jejím složení.

2.2.1 Složení buněčné stěny kvasinek

Nejvíce prozkoumané buněčné stěny jsou buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Buněčná stěna kvasinky *S. cerevisiae* (obrázek 2) se skládá především z polysacharidů tvořenými třemi cukry, polysacharidy glukózy, manózy a *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc). Glukózové zbytky jsou spojeny s dalšími molekulami glukózy pomocí β -1,3 a β -1,6 vazeb a na GlcNAc přes β -1,4- vazbu. Důležitou složkou v buněčné stěně je také chitin, který přispívá k nerozpustnosti vláken [10].

Buněčná stěna *S. cerevisiae* je složená ze dvou vrstev, a to z vnější a vnitřní. Hlavním skeletálním polysacharidem vnitřní vrstvy buněčné stěny je β -1,3-glukan, který tvoří kostru buněčné stěny. Na tu jsou kotvené její ostatní složky a β -1,6-glukan, který zprostředkovává

zesíťování mezi β -1,3-glukanem a manoproteiny vnější vrstvy buněčné stěny. Glukany dodávají buněčné stěně mechanickou pevnost, odolnost, elasticitu a osmotickou stabilitu. Minoritní složkou vnitřní vrstvy buněčné stěny je chitin. Na vnějším povrchu stěny jsou disulfidickými můstky spojeny manoproteiny, které omezují propustnost stěn a určují poréznost buněčné stěny. Jednotlivé složky buněčné stěny jsou spojeny kovalentními vazbami [11].



Obrázek 2: Složení a struktura buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae* [9]

2.2.1.1 β -1,3-glukan a jeho syntéza

β -1,3-glukan je velmi specifický pro kvasinky, protože se nachází pouze v buněčné stěně kvasinek a hub, a proto je unikátním terčem pro výzkum a vývoj nových antimykotik, jako je např. kaspofungin, který je účinný proti různým druhům *Candida* či *Aspergillus* [12].

β -glukany jsou polymery glukózy, které tvoří polovinu sušiny buněčné stěny. V *S. cerevisiae* přibližně 80 % z těchto β -glukanů jsou spojené β -1,3-vazbou. Pro β -1,3-glukanové řetězce je charakteristický stupeň polymerace cca 1500 glukózových jednotek v jednom řetězci. β -1,3-glukan je přítomen v celé řadě hub, kde slouží jako stavební polysacharid, podobně jako celulóza u rostlin [13]. V buněčné stěně kvasinek má β -1,3-glukan strukturu dvoušroubovice, která je jedinečná v rodině polysacharidů a poskytuje pružnost a pevnost buněčné stěně. Biomedicínské vlastnosti kvasinkového β -1,3-glukanu a jeho derivátů jsou velmi cenné. Byly dokázány jeho antibakteriální, antivirové a protinádorové efekty a také bylo prokázáno, že urychluje hojení ran a posilují imunitní systém [14].

Tento polymer je syntetizován v cytoplazmatické membráně specifickým enzymem β -1,3-glukan syntázou (GS), který užívá uridin difosfát-glukózu (UDP-glukózu) jako substrát. Komplex β -1,3-glukan syntáza nacházející se v plazmatické membráně, vytlačuje polymer β -1,3-glukanu ven z plazmatické membrány a další enzymatické rodiny jsou odpovědné

za začlenění β -1,3-glukanu v buněčné stěně (např. proteiny rodiny Gas, Phr) [15]. β -1,3-glukan syntáza je tvořená katalytickou a regulační podjednotkou. Katalytickou podjednotku kódují dva homologní geny, *FKS1* a *GSC2*. Fks1p je hlavním proteinem během vegetativního růstu a Gsc2p plní svojí funkci při stresových podmínkách růstu kvasinky [16]. *S. cerevisiae* má také třetí člen *FKS* rodiny, *FKS3*. Fks3 protein není zahrnutý v procesu syntézy buněčné stěny, ale hraje roli při páření [17]. Rho1 protein, jako regulační podjednotka β -1,3-GS, má funkci koordinátora v organizaci buněčné stěny a v polarizaci aktinového cytoskeletu regulací signalizace prostřednictvím dráhy buněčné integrity [10].

2.2.1.2 β -1,6-glukan a jeho syntéza

Zbývajících 20 % β -glukanu v *S. cerevisiae* je vázaný vazbou β -1,6 [13]. β -1,6-glukan je rozvětvený, ve vodě rozpustný polymer, který obsahuje průměrně kolem 130–150 glukózových jednotek. Není známo, zda β -1,6-glukan je syntetizovaný podobně jako β -1,3-glukan, nebo jako ve vodě rozpustná větvená molekula β -1,3-/ β -1,6-glukan jako například u *Sclerotium rolfsii* [8]. Jeho syntéza vyžaduje komponenty sekreční dráhy (jako např. *N*- a *O*-glykany) nebo buněčného povrchu, jako v případě chitinu či β -1,3-glukanu. U *S. cerevisiae* ovlivňují hladinu β -1,6-glukanu geny sekreční dráhy i buněčné stěny [10]. Mezi ně patří geny: *KRE5*, *BIG1* a *ROT1*, *KRE6* a *SKN1*, *KRE1*, *KRE9* a *KNH1* [18]. Avšak většina těchto genů není přímo zahrnuta v syntéze β -1,6-glukanu a brání identifikaci genu, resp. genů kódujících β -1,6-glukan syntázu (β -1,6-GS) [10]. Doposud nepublikované výsledky hovoří, že β -1,6-glukan je pravděpodobně syntetizován z β -1,3-glukanu v procesu transglykozylace na úrovni buněčné stěny, ale tato domněnka se zatím nepotvrdila [13].

β -1,6-glukan se považuje za klíčový komponent buněčné stěny, protože navzájem váže její ostatní složky. V buněčné stěně slouží na spojení proteinů vázaných glykosyl fosfatidyl inositolem (GPI) s β -1,3-glukanem a chitinem. Ve stresových podmínkách výstavby buněčné stěny, kde probíhá zvýšená syntáza chitinu, slouží jako akceptorové místo pro nově vznikající chitin [8].

Data ukazují, že stupeň rozvětvení β -1,6-glukanu se liší v závislosti na druhu kvasinek, např. polymer β -1,6-glukanu *C. albicans* má více lineárních struktur, než je nalezeno u *S. cerevisiae* [19].

2.2.1.3 Chitin a jeho syntéza

Chitin je lineární polymer *N*-acetylglukosaminu vázaný β -1,4 vazbou, který tvoří mikrofibrily stabilizované vodíkovými vazbami. Jedná se o minoritní složku *S. cerevisiae* tvořící 1–2 % suché hmotnosti buněk, ale má klíčovou roli v morfogenezi a je nutná pro životaschopnost buněk [20]. Chitin se nachází v primárním septu, a to především ve volné formě, v mateřském pupenu a chitinovém prstenci. Chitin je redukujícími konci vázaný na neredukující konce β -1,3-glukanu [10]. Z celkového množství chitinu je přibližně 10 % rovnoměrně rozptýleno po celém obvodu stěny buňky. Chitin izolovaný ze zárodečných jizev obsahuje asi 200 GlcNAc monomerů vázaných β -1,4-glykosidickou vazbou, není však známo, zda tento počet platí i pro chitin v obvodové stěně [8].

Za normálních podmínek dochází k rozložení chitinu v obvodové stěně po cytokinezi s výsledným obsahem 0,1–0,2 % v obvodové stěně a 1–2 % v jizvičkách. V buňkách s geneticky zeslabenou stěnou nebo jako odpověď buňky na poškození vnějšími vlivy jsou chitin syntázy (CS) zapojené v záchranném mechanismu a obsah chitinu může být více než 20 % suché hmotnosti stěny [8].

Syntéza chitinu je katalyzovaná chitin syntázami, které využívají uridin difosfát-*N*-acetylglukózamin (UDP-GlcNAc) jako substrát. Syntéza UDP-GlcNAc probíhá v cytoplazmatické membráně. CS kromě katalýzy samotné polymerace chitinu, má schopnost vytlačit polymer chitinu přes plazmatickou membránu do buněčné stěny. V *S. cerevisiae* byly identifikovány tři chitin syntázy: chitin syntáza I (CSI), chitin syntáza II (CSII) a chitin syntáza III (CSIII). Aktivita CSI může být odhalena aktivací trypsinu a inkubací za přítomnosti Mg^{2+} při optimálním pH 6,5, aktivita CSII je detekovaná po proteolytické aktivaci za přítomnosti Co^{2+} a při optimálním pH 8 a CSIII je aktivní při pH 8, za přítomnosti Co^{2+} bez proteolytické aktivace. Jelikož je chitin nepostradatelný pro vývoj a morfogenezi buněčné stěny kvasinek, značná pozornost se věnuje výzkumu chitin syntézových inhibitorů a chitinolytických enzymů jako potenciálních fungicidů a insekticidů [10].

2.2.1.4 Proteiny buněčné stěny

Vnější vrstva buněčné stěny kvasinek je tvořená manoproteiny. Je mnohem méně propustná pro makromolekuly než vnitřní fibrilární vrstva. Je to způsobeno převážně dlouhými a velmi větvenými bočními sacharidovými řetězci, které jsou vázané *N*-glykosidickou vazbou na asparaginový zbytek proteinu a početnými disulfidickými můstky v proteinech [8].

Manoproteiny z buněčné stěny kvasinek mohou být rozděleny do čtyř skupin:

- 1) proteiny, které nejsou vázané kovalentní vazbou, jako je Bgl2p [22],
- 2) proteiny, které jsou vázané kovalentní vazbou na buněčnou stěnu pomocí disulfidických můstků [23],
- 3) Pir proteiny, které jsou spojeny alkalicky citlivou vazbou přes glutamin s molekulou β -1,3-glukanu [25],
- 4) proteiny buněčné stěny, které jsou kovalentně spojené s β -1,3-glukanem přes β -1,6-glukan, na který jsou navázané zbytkem GPI [26].

U některých hub kovalentně vázané proteiny buněčné stěny se účastní procesů jako je zadržování vody, přilnavost, virulence, hostitel-patogenní interakce.

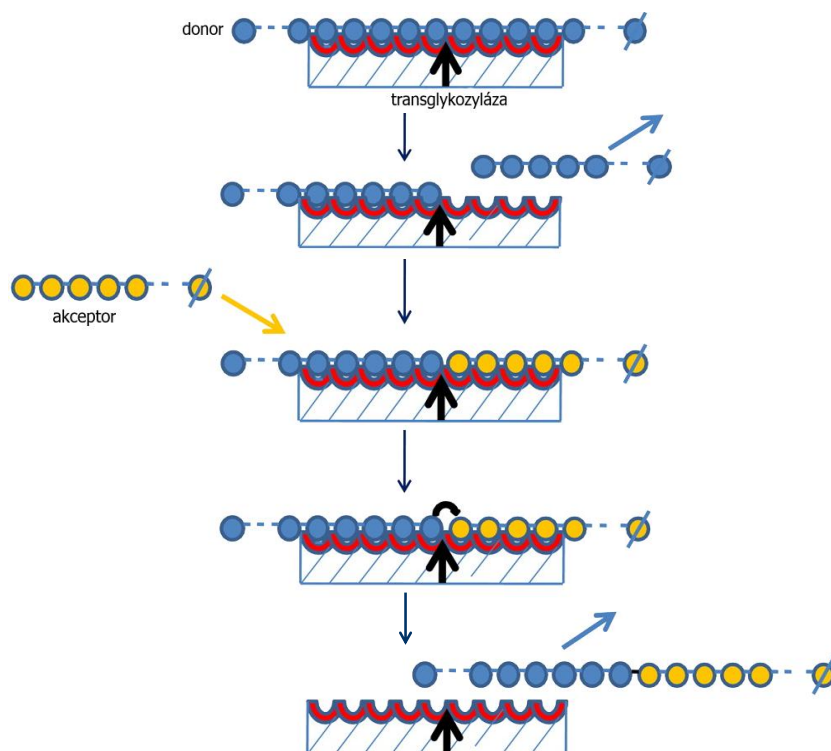
Pro *S. cerevisiae* byly popsány dva typy oligosacharidické modifikace proteinů: *N*-glykosilované a *O*-manosilované proteiny. *N*-glykosilované proteiny přijmou oligosacharid prostřednictvím *N*-glykosidické vazby mezi GlcNAc a asparaginový zbytek, zatímco *O*-manosilované proteiny přijímají krátké manózové řetězce na hydroxylové postranní řetězce serinu nebo threoninu pomocí α -manosylové vazby [10].

2.3 Transglykozylázy a transglykozylační mechanismus

Konečná fáze stavby buněčné stěny, vznik supramolekulární struktury pomocí kovalentních „cross-link“ vazeb mezi jednotlivými složkami, je katalyzovaná enzymy, které se nacházejí v buněčné stěně [28]. Na základě strukturní podobnosti buněčné stěny kvasinek s buněčnou stěnou rostlin se zjistilo, že těmito enzymy jsou tzv. transglykozylázy. Typické příklady transglykozyláz vyskytujících se v buněčných stěnách rostlin jsou xyloglukan endotransglykozylázy/hydrolázy (XET/XTH), které provádí endolytické štěpení xyloglukanových řetězců s následným převodem nově vytvořeného redukujícího konce na neredukující konec jiné molekuly xyloglukanu [29].

Protože se v buněčné stěně nevyskytují žádné přenašeče energie, jako např. ATP, nová glykosidická vazba vznikne na úkor uvolnění energie při porušení již existující vazby [28].

Transglykozylační mechanismus je dvojfázový. V první fázi dochází k asociaci molekuly donoru (poly-, resp. oligosacharidu) s transglykozylázou. Následně transglykozyláza štěpí molekulu donoru. Redukující část molekuly donoru je odstraněna. Část molekuly donoru s nově vytvořeným redukujícím koncem je navázána do aktivního místa transglykozylázy, čímž se vytvoří kovalentní glykozyl-enzymový intermediát. V druhé fázi přenesení enzym tuto část molekuly donoru na hydroxylovou skupinu neredukujícího konce molekuly akceptoru (obrázek 3). Podle struktury molekuly donoru a akceptoru rozlišujeme homo- a heterotransglykozylacii. Pokud jsou donorem a akceptorem různé molekuly stejného sacharidu, hovoříme o homotransglykozylacii [31], v opačném případě se jedná o heterotransglykozylacii [32].



Obrázek 3: Transglykozylační mechanismus [33]

2.3.1 Transglykozylázy kvasinek

Podobně jako v říši rostlin, také v říši kvasinek a hub nacházíme analogy transglykozyláz. Jejich potenciální úloha je částečně známá na úrovni molekulové biologie a genetiky, a jen málo z nich bylo charakterizovaných na úrovni transglykozylační aktivity. Objasnění této aktivity u kvasinek a hub by mohlo pomoci ve vývoji nových antimykotik jako inhibitorů těchto enzymů.

Transglykozylázy kvasinek patří do rodiny glykozylových hydroláz (GH). Nečastější jsou GH 72 (Gas, Gel, Phr) a GH 16 (Crh).

2.3.1.1 Transglykozylázy rodiny GH 72

GH 72 zahrnuje endo- β -1,3-glukanázy, které mají vysokou transglykozylační aktivitu. Tyto enzymy se také označují jako β -1,3-glykوترansferázy. Do rodiny GH 72 patří proteiny rodiny Gas *S. cerevisiae*, Phr proteiny *C. albicans* a Gel proteiny *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). Gel/Gas/Phr rodiny proteinů hrají zásadní roli v biogenezi buněčné stěny [34].

Rodinu Gas proteinů tvoří pět členů, tři z nich jsou přítomny v plazmatické membráně vegetativních buněk (Gas1p, Gas3p a Gas5p), Gas2p a Gas4p jsou specifické pro askospory. Gas1p má aktivitu β -1,3-glukan elongázy, protože tento enzym je schopný hydrolyzovat glykosidické vazby v β -1,3-glukanových řetězcích, odštěpit část β -1,3-glukanu a připojit redukující konec odštěpené části k neredukujícímu konci dalšího řetězce β -1,3-glukanu, čímž dojde k elongaci polysacharidu β -1,3-glukanu. Tato aktivita má v biologii hub velký význam pro změnu glukanu, který vyžaduje rovnováhu mezi hydrolýzou a nově začleněným β -1,3-glukanem do buněčné stěny. Výsledky byly získány využitím fluorescenční metody a bylo zjištěno, že veškeré Gas proteiny jsou specifické k β -1,3-glukanu a β -1,3-oligoglukosidům. Úloha ostatních členů Gas rodiny je méně známa 0.

Protože Gas proteiny jsou přes GPI kotveny k vnější vrstvě plazmatické membrány nebo membrány spor, jsou vystaveny změnám pH v okolí buňky kvasinky. Toto je pravděpodobně důvod, proč Gas1p a Gas5p jsou neaktivnější v rozsahu pH 3,5–5, což koresponduje se skutečností, že růstové médium pro vegetativní růst je obvykle kyselé. Naproti tomu pH optimum Gas2p a Gas4p je 5–6, přibližuje se tedy k intracelulárnímu pH cytoplazmy v buňce kvasinek, které je mezi 6,5–6,9. Rozdíly v pH optimu jednotlivých transglykozyláz nejsou až tak výjimečné [35].

Analogy GAS genů u patogenní kvasinky *C. albicans* jsou PHR geny, které jsou regulovány extracelulárním pH přes Rim101p-závislou nebo nezávislou dráhu. Části lidského těla kolonizované *C. albicans* se velmi liší hodnotou pH. V krvi je mírně zásadité pH 7,3, v ledvinách, játrech nebo dvanáctníku je pH téměř neutrální a kyselé pH je v žaludku pH 2 či v pochvě pH 4,5. Mezi geny regulované Rim101p patří PHR1 a PHR2, které kódují glykoproteiny s vysokou podobností. Tedy i proteiny Phr1 a Phr2 jsou funkčně spojeny a regulace jejich exprese je ovlivněna pH okolního prostředí *in vitro* a *in vivo*. Exprese Phr1p probíhá při pH 5,5 nebo vyšší, zatímco exprese Phr2p při pH 5,5 nebo nižší. Kromě PHR1 a PHR2 byly v *C. albicans* identifikovány další tři geny, PHR3, PGA4 a PGA5, které nejsou závislé na pH růstového média. Virulence závisí na schopnosti mikroorganismu přizpůsobit se v různých místech lidského organismu, tedy v místech s různým pH 0.

Nedostatek Phr1p nebo Phr2p u *C. albicans* způsobuje změny v morfogenezi a biogenezi buněčné stěny v závislosti na okolním pH. Při pH 6 nebo nižším mají mutantní buňky bez funkčního *PHR1* genu ($\Delta phr1$) stejný fenotyp jako divoké kmeny, ale pokud pH vzroste nad 6, buňky $\Delta phr1$ mají defektní fenotyp. Čím je pH prostředí vyšší, tím více dochází ke změnám. pH 7,5–8 způsobí, podobně jako v případě *S. cerevisiae* při delecí *GAS1*, že buňky jsou proti divokému kmenu větší, více kulaté a napuchnuté. V omezených pH podmínkách mutant bez *PHR1* genu má redukováný β -1,3-glukan a vzrůstá akumulace chitinu. Naopak fenotyp mutantu bez funkčního *PHR2* genu je opačný, což plně souhlasí s pH-závislou expresí *PHR1* a *PHR2* genů. *PHR1* mutant *C. albicans* bez funkčního *PHR1* je avirulentní v případě systémových infekcí myši jako modelových organismů, ale schopnost způsobovat vaginální infekce u potkanů zůstává nezměněna. Navíc tento mutant projevuje defekty v adhezi a invazi do lidského epitelu, má teda sníženou schopnost infikovat hostitele [36].

2.3.1.2 Transglykozylázy rodiny GH 16

Kromě enzymů rodiny GH 72 operujících na β -1,3-glukanu, jsou v buněčných stěnách kvasinek obsaženy i další transglykozylázy patřící do rodiny GH 16 [35]. Do této skupiny enzymů patří proteiny rodiny Crh. Crh proteiny *S. cerevisiae*, Crh1p a Crh2p jsou odpovědné za heterotransglykozylační připojení nově tvořících se řetězců chitinu k β -1,6-glukanu a k β -1,3-glukanu. Dále se podílejí na homotransglykozylačním propojení nascentních řetězců chitinu, a to jak *in vivo*, tak *in vitro* [28]. Crh1p a Crh2p jsou aktivní v průběhu vegetativního růstu. Crr1p je funkční homolog Crh1p a Crh2p a je exprimován pouze během sporulace. Protein Crr1 je zodpovědný za vázání chitinu na β -1,3-glukan v buněčných stěnách askospor a jeho nedostatek v homozygotním mutantu *crr1* vede k nesrovnalostem ve vnější chitosanové vrstvě, která není správně připojena k vnitřní β -1,3-glukanové vrstvě [38].

Transglykozylační aktivitu Crh1p a Crh2p poprvé v roce 2002 identifikoval Cabib a spol., který pro sledování molekul využil β -1,3-glukooligosacharidy konjugované se sulforodaminem a zjistil, že byly připojeny k chitinu v jizvě a v bočních stěnách buněk, ale ne v mutantech *crh1* a *crh2*, ani v *csIII* [38].

2.4 Metody použité v této práci

2.4.1 Analytické metody

Analytické metody se využívají k chemické analýze látek, díky které můžeme zjistit přítomnost nebo množství chemických látek ve vzorku. Mezi nejvyužívanější analytické metody dnes patří analytická separace látek, kde hlavní dominantu tvoří metody chromatografické a elektromigrační [39].

2.4.2 Chromatografické metody

Jako chromatografie se označuje proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednu nepohyblivou (stacionární) a druhou pohyblivou (mobilní). Při této metodě se využívá fyzikálně-chemických interakcí, např. adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod. Stacionární fázi (tzv. sorbentem) mohou být částičky tuhé látky, tenká vrstva nanesená na pevných částicích nebo tenký film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry, mobilní fáze pak bývá kapalina či plyn [40]. Složky směsi látky jsou přítomné v mobilní fázi a pohybují se stacionární fází, kde jsou interakcí se stacionární fází zpomalovány, proto se pohybují různou rychlostí. Míra zpomalení jednotlivých složek závisí na hodnotách distribučních konstant. Látky, které na sebe se stacionární fází působí silněji, se pohybují pomaleji, než látky, u kterých je interakce slabší. Aby došlo k rozdělení směsi látek na zóny jednotlivých složek, je potřeba, aby dráha, kterou vzorek urazí podél stacionární fáze, byla dostatečně dlouhá a distribuční konstanty rozdílné [41].

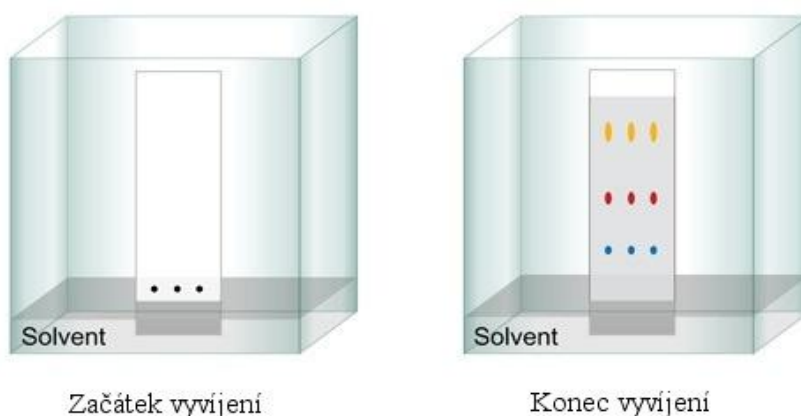
2.4.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC), z angl. Thin Layer Chromatography, v planárním uspořádání patří mezi instrumentálně nejjednodušší variantu chromatografie. Je to velmi rychlá a levná metoda s širokým praktickým uplatněním. Od kapalinové chromatografie se liší v uspořádání stacionární fáze do tenké vrstvy namísto kolony. Mobilní fáze není čerpána jako u kapalinové chromatografie, ale je nasávána kapilárními silami tenké vrstvy.

Na skleněnou, hliníkovou nebo plastovou chromatografickou desku, která je hlavním prvkem TLC, je nanesená tenká vrstva sorbentu o tloušťce 0,1–0,5 mm. Nejčastějším sorbentem v TLC je silikagel. Také se využívá oxid hlinitý, celulóza a polyamid. Komerčně dostupné jsou již hotové desky s nanesenou vrstvou sorbentu obsahující pojivo.

Na desku se 1–2 cm od okraje vyznačí start, kam se pomocí mikropipety nanese vzorek. Takto připravená deska se vyvíjí v uzavřené skleněné komoře, kde je na dně vrstva mobilní fáze (obrázek 4). Linie startu s naneseným vzorkem nesmí být ponořena do kapaliny. Vzlínající mobilní fáze unáší jednotlivé složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na stacionární fází a čím lépe jsou rozpustné v rozpouštědlu. Vyvíjení se ukončí, až čelo rozpouštědla dosáhne předem vyznačené vzdálenosti od startovní linie. Poté se destička

vyjme a vysuší. Pokud rozdělené složky nejsou barevné, musí být lokalizovány. Často se využívá postřík destičky vhodným reagentem. U fluoreskujících látek se pro detekci využívá ultrafialová lampa. Při vyhodnocení chromatogramu se využívá tzv. retenční (retardační) faktor R_F , což je podíl vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti, kterou urazila mobilní fáze od startu [42].



Obrázek 4: Schéma chromatografie na tenké vrstvě [43]

2.4.1.3 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je určena k separaci biologických makromolekul, které lze velmi těžko separovat, neboť tyto látky mají minimální rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech. Je ale známo, že antigeny mohou vázat protilátky, inhibitory mohou vytvářet komplexy s enzymy apod. Afinitní chromatografie je založena na tom, že na nosič je pomocí kovalentní vazby navázán vhodný ligand, který je schopen vytvářet specifický komplex s určitou biomakromolekulou, kterou je např. enzym, protein, nukleová kyselina apod. Princip afinitní chromatografie je znázorněn na obrázku 5.

Do kolony naplněné stacionární fází, obsahující ligand, se vnese roztok vzorku, který chceme separovat. Po promytí zůstává separovaná látka zadržována na koloně, neboť se vytvoří komplex biomolekula-ligand, zatímco složky vzorku, které nemají afinitu k ligandu, projdou kolonou bez zadržení a jsou vymyty. Vzniklý komplex je reverzibilní a použitím vhodného tlumivého roztoku nebo rozpustného protiligandu je možné vázané biomolekuly z komplexu uvolnit. Poté lze kolonu použít pro další separaci.

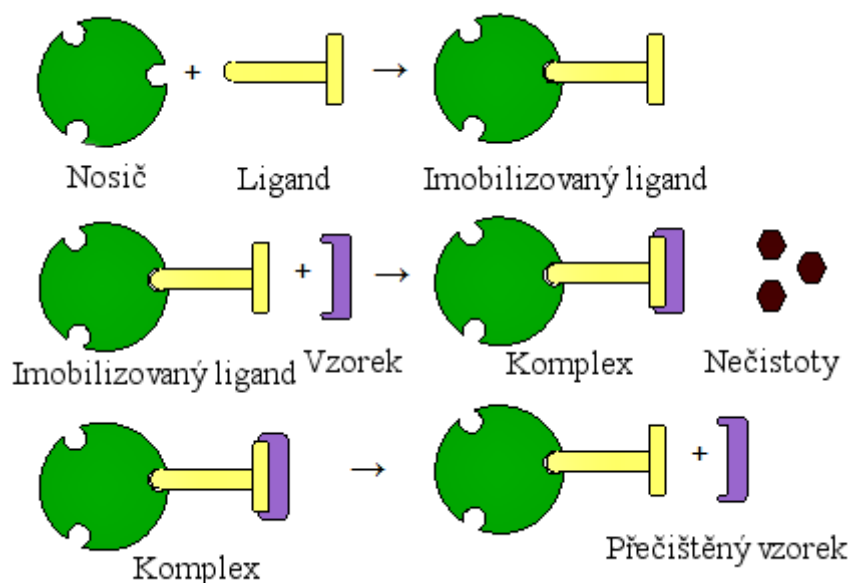
Jako nosiče pro navázání ligandu se používají látky, jejichž základem jsou polysacharidy (celulóza, agarosa a dextranové gely) nebo zesíťovaný polyakrylamid. Ideální nosič pro afinitní chromatografii by měl mít následující vlastnosti:

- nerozpustnost
- nulová absorpční kapacita
- dostatečná permeabilita a velký specifický povrch
- vysoká pevnost a vhodná forma částic
- chemická reaktivita umožňující vazbu ligandu

- chemická stabilita za podmínek požadovaných pro vazbu, desorpsi a regeneraci
- resistance k enzymovému a mikrobiálnímu napadení
- hydrofilní charakter.

Nosič splňující všechny tyto požadavky neexistuje, proto se musí zvolit takový, který nejlépe vyhovuje podmínkám dané reakce.

Ligandy pro afinitní chromatografii musí především obsahovat skupinu, kterou lze využít pro kovalentní vazbu na pevný nosič. Dále jsou vhodné sloučeniny, které tvoří specifické, pevné a reversibilní komplexy. Využívají se např. specifické inhibitory, na kterých lze dělit enzymy a lektiny a na kterých se separují různé glykoproteiny, nukleové kyseliny a bílkovinné antigeny, např. lidský sérový albumin, apod. [44].



Obrázek 5: Princip afinitní chromatografie

2.4.1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

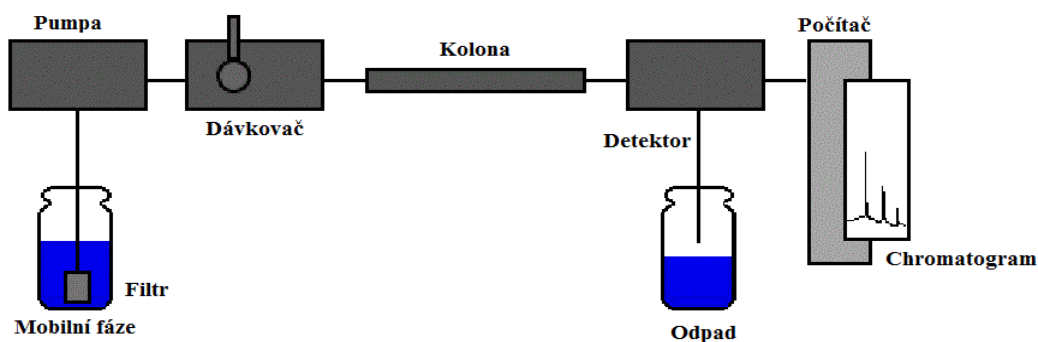
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), z angl. High Performance Liquid Chromatography, představuje vyspělejší techniku kapalinové chromatografie a patří mezi nejvyužívanější separační metody. Díky využívání kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic vyniká HPLC vysokou účinností separačního procesu. Separační kolony pro HPLC jsou typické vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze, proto kladou prostupující kapalině značný odpor a je potřeba pracovat při vysokých hodnotách tlaku [45].

Jednou z předností HPLC je možnost účinně ovlivňovat separaci nejenom volbou stacionární fáze, ale také změnami složení mobilní fáze. Kapalná fáze není pouze nosičem vzorků, ale podílí se na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází. Další výhodou je široký rozsah použitelnosti. Naopak mezi nevýhody patří náročná a poměrně drahá instrumentace (obrázek 6).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je založena na separaci látek na základě jejich

diferenciální migrace v koloně, tedy mezi stacionární a mobilní fází. Rychlost je závislá na interakci analytu s mobilní fází, na sorpci se stacionární fází a interakci mobilní fáze se stacionární fází. Všechny látky, které interagují s nepohyblivou fází, se kolonou pohybují pomaleji než neinteragující mobilní fáze, a to tím rychleji, čím je interakce se stacionární fází slabší [41].

HPLC pracuje tak, že jsou analyty dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta se přivádí ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla, které ji přes dávkovací zařízení vzorku dopravuje do kolony, kde dochází k ustanovení rovnováhy mezi mobilní fází a stacionární fází a k rozdělení směsi podle fyzikálně-chemických vlastností. Poté, co analyt projde separační kolonou, jsou analyty v mobilní fází detekovány v průtokové cele detektoru, kde jsou měřeny veličiny jako např. fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je chromatogram, což je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku [46].



Obrázek 6: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie [47]

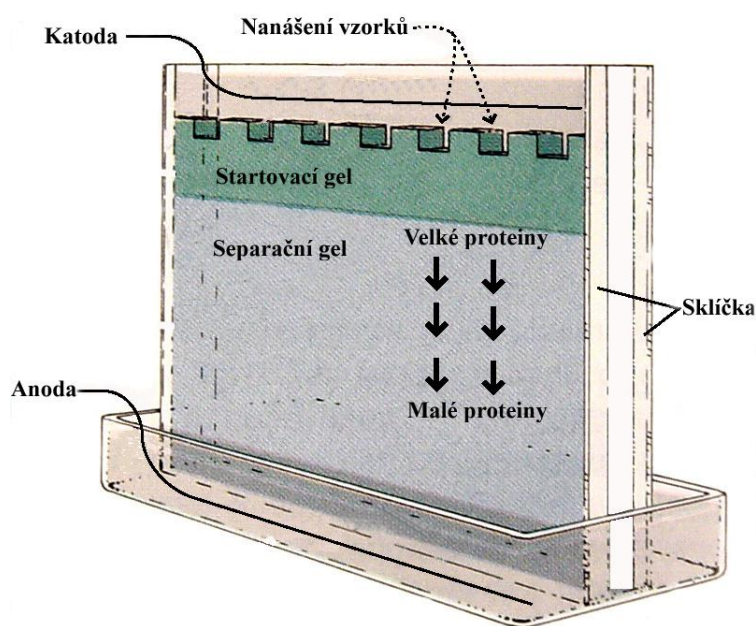
2.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s využitím dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je jedna z technik zónové elektroforézy. Provádí se na nosičích, které jsou uspořádány do sloupce, mluvíme tedy o sloupcové elektroforéze. Elektroforetické nosiče by měly mít co nejméně adsorpčních vlastností. Při elektroforéze dochází k pohybu iontů v elektrickém poli, proto se využívá k separaci látek nesoucí elektrický náboj (ionty). Vedle elektroforetické pohyblivosti se uplatňuje i separace na principu molekulového síta. Molekuly se rozdělují na základě velikosti (molekulové hmotnosti). Jejich pohyb je omezován gelem a rychlost pohybu závisí na velikosti pórů v gelu. Nejčastěji se metoda SDS-PAGE využívá k separaci proteinů (obrázek 7).

Zónová elektroforéza může být buď v kontinuálním, nebo diskontinuálním systému. Diskontinuální elektroforéza používá 2 gely s různě velkými póry a lišícím se pH, které se obvykle liší asi o 2 jednotky. Gel, který je v horní části, má velké póry, nižší pH (cca 6,8) a přichází do styku s dělenou směsí, se označuje jako startovací nebo zaostřovací. Gel pod ním je tzv. separační gel a jeho hodnota pH je cca 8,8, kdy mobilita iontů je vysoká.

Dodecylsulfát sodný (SDS) je anionaktivní detergent a nese velký záporný náboj, který

přenesu na protein. Tím se vyrovnávají nábojové rozdíly bílkovinných molekul a ty se pak v gelu pohybují pouze na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). SDS se váže na proteiny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny a při tom sjednocují i svou konformaci. Po nanesení vzorku na gel a vložení gelu do elektrického pole migrují proteiny ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Během migrace se proteiny v polyakrylamidovém gelu separují na základě molekulového síta [44].



Obrázek 7: Aparatura pro SDS-PAGE [48]

2.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS), z angl. Mass Spektrometry, je velmi účinná identifikační metoda využívaná k řešení problémů v analytické a organické chemii, biochemii a i při analýze anorganických materiálů a povrchů tuhých látek. Hmotnostní spektrometrie převádí vzorek na ionizovanou formu pomocí plynné fáze a vzniklé ionty dělí na základě hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z). MS využívá působení magnetického, případně elektrického pole. Hmotnostní spektrometr se skládá z pěti základních částí:

1. Iontový zdroj – vytváří ionty z elektricky neutrálních molekul
2. Analyzátor – dělí ionty na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z)
3. Detektor – registruje ionty opouštějící analyzátor a převádí je na elektrický signál
4. Datasystém – zpracovává signál detektoru a zajišťuje kompletní kontrolu a řízení celého systému
5. Vakuový systém – zajišťuje udržení dostatečného vakua v systému hmotnostního spektrometru [49].

2.4.3.1 MALDI TOF

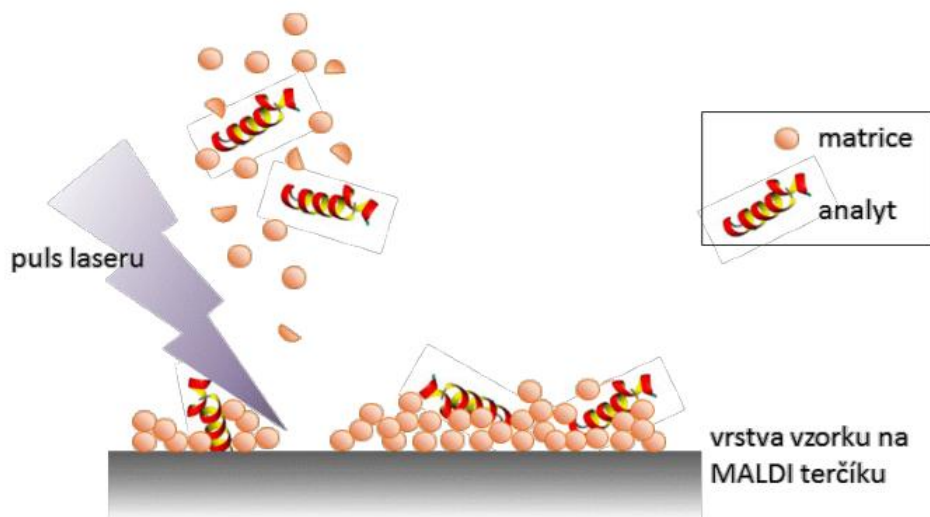
MALDI, z angl. matrix assisted laser desorption/ionization, patří mezi hmotnostní spektrometr, kde se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní lze vyčíslit rychlost částice.

Na vhodném nosiči, např. na nerezové destičce, je nanесena směs matrice a vzorků v pevném stavu. Destička je pak zasažena nanosekundovým pulzem laseru (obrázek 8). Matrice energii pulzu absorbuje a její rozklad způsobí ionizaci molekuly vzorku. Touto ionizací může být:

- adice kationtu (H^+ , Na^+) nebo aniontu na molekulu vzorku,
- disociace H^+ z molekuly vzorku,
- vznik radikálu odštěpením elektronu,
- cílené rozkouskování (vysokou energií laseru) molekuly vzorku a opět spojení kousků.

Ionty analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem (25–30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do vakua, které je v trubici detektoru letu. V trubici se ionty pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Dochází zde i k měření doby letu částice, z níž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice m/z .

Výhodou hmotnostní spektrometrie MALDI je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se vzorek nerozpadá, proto lze měřit složitější směsi a zanedbatelný je i vliv pozadí. Tato metoda byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, nyní se ale využívá i pro analýzu nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. MALDI můžeme kombinovat jako hmotnostní detektor se separačními metodami, např. gelovou elektroforézou nebo kapalinovou chromatografií [50].



Obrázek 8: Schéma MALDI [51]

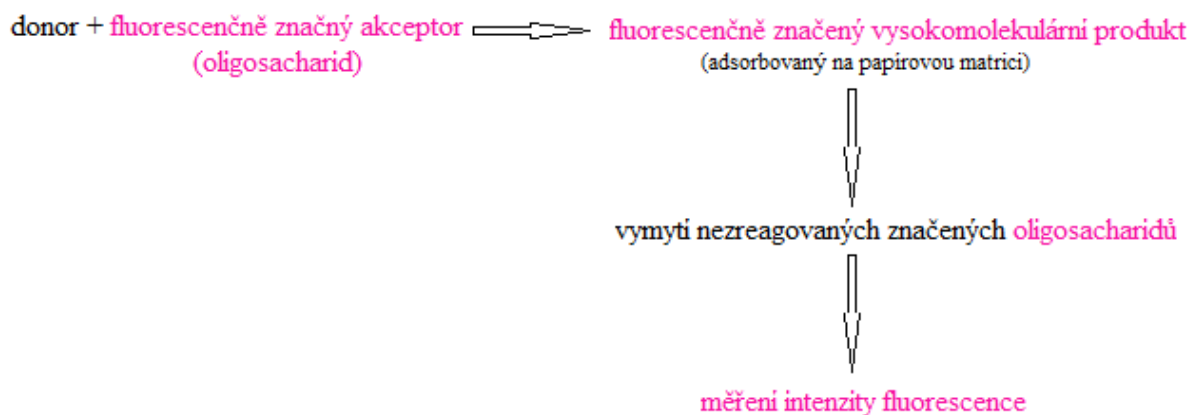
2.4.4 Fluorescenční papírová metoda

Fluorimetrie je analytická metoda využívající schopnosti některých látek emitovat (vysílat) po předešlém převedení do excitovaného (vzbuzeného) stavu fluorescenční záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti. K převedení do excitovaného stavu je využívána absorpce ultrafialového nebo viditelného záření.

Jako fluorescence se označuje děj, kdy po absorpci fotonu excitovaná molekula velmi rychle odevzdá získanou energii okolí a nezářivými přechody a vibrační relaxací se postupně posouvá do nižších excitovaných stavů. Nezářivý přechod ze základní vibrační hladiny z prvního excitovaného stavu do základního stavu bývá většinou pomalejší. Až mezi těmito hladinami (první excitovaný stav a základní stav) vedle nezářivých přechodů může být uplatněn přechod spojený s emisí fotonu. Právě tato emise se označuje jako fluorescence. Doba dosvitu je řádově 10^{-6} – 10^{-9} s [52].

Fluorimetrie se využívá při barvení oligosacharidů (akceptory), které jsou značené různými fluorescenčními značkami, např. sulforodaminem nebo pyridylaminem [53]. Reakční směs se nanáší na celulóзовou matrici a nezreagované oligosacharidy (fluorescenčně značené akceptory) jsou vymyté. Intenzita fluorescence se poté měří ve vysokomolekulárním fluorescenčně označeném produktu, který se pomocí vodíkových vazeb zachytil na matrici (obrázek 9).

Tato metoda byla využita např. při stanovení transglykozylační aktivity XET nebo aktivity transglykozylázy *S. cerevisiae* Gas1p a Gas2p [28].



Obrázek 9: Schéma fluorescenční papírové metody

2.4.5 Dialýza

Dialýza je separační technika využívající difúze nízkomolekulárních látek semipermeabilní dialyzační membránou, nepropustnou pro velké molekuly a částice, z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací. V okamžiku, kdy je koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách polopropustnou membrány vyrovnaná, proces se zastaví. Rychlost této separační techniky závisí na koncentračním spádu (z počátku je nejrychlejší, postupně zpomaluje), který je převážně ovlivněn poměrem objemů vně

a uvnitř membrány. Rychlost dialýzy také závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na síle membrány, na elektrických vztazích mezi membránou a difundujícími částicemi a na velikosti plochy. Dialýza se nejčastěji využívá v případech, kdy potřebujeme vysokomolekulární látky zbavit nízkomolekulárních nečistot, např. oddělní soli od roztoku bílkovin, kdy molekuly bílkovin mají rozměry od několika do několika set nanometrů a díky své velikosti, neprocházejí otvory dialyzačních membrán [54].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

- Centrifuga Allegra X-22R, *Backman Coulter, USA*
- Rotační vakuová odparka s vodní lázní Vacuum rotary evaporator type 351, *Unipan, Polsko*
- Spektrofotometr Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, *Bio-Tek, USA*
- Hmotnostní spektrometr MALDI – TOF/TOF UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF, *Bruker Daltonics, Bremen, Německo*
- Aparatura pro SDS-PAGE Mini-PROTEAN® Tetra Cell, *Bio-Rad, USA*
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf, Agilent 1100 HPLC, *Hewlett Packard, USA*
- Třepačka Shaking incubator, *N-Biotek, Korea*
- Vortex mixer VM-300, *Gemmy industrail Corp., Taiwan*
- Míchačka Rocking platform, *Biometra, Německo*
- Koncentrátor Savant speed vac, *BioSurplus, USA*
- Autokláv PS20A, *Chirana, Česká republika*
- Očkovač BioSTAR Plus, *Telstar, Španělsko*
- Kolotoč Rototor SB2, *STUART, Spojené království*
- Kolona TSKgel G3000 SWXL, 7,8 mm x 300 mm, *TosoHaas, Japonsko*
- Termostat Thermo-Shaker TS-100, *Biosan, Lotyšsko*

3.2 Chemikálie

- Oligosacharidy, připravil Dr. Tibor Lipka, *Chemický ústav SAV v Bratislavě, Slovenská republika*
- Fluorescenčně značené oligosacharidy, dar od prof. Vladimíra Farkaše, *Chemický ústav SAV v Bratislavě, Slovenská republika*
- Kyanoboritan sodný (NaCNBH_3), *Merck Millipore, Německo*
- Octan amonný ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), *Lachema, Česká republika*
- Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), *Emsure, Německo*
- Methanol (CH_3OH), *Merck Millipore, Německo*
- Orcinol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$), *Lachema, Česká republika*
- Ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), čistota p. a. (min. 96,3 %), *Slavus, Slovenská republika*
- Nesslerovo činidlo ($\text{K}_2[\text{HgI}_4]$ v KOH), *Merck Millipore, Německo*
- Tetraboritan sodný ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), *Lachema, Česká republika*
- Sulforodamin ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$), *Sigma-Aldrich, USA*
- Aceton (CH_3COCH_3), čistota p. a., *Slavus, Slovenská republika*
- Butanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$), *Merck Millipore, Německo*
- Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$, CHCA), *Sigma-Aldrich, USA*
- Acetonitril (CH_3CN), *Merck Millipore, Německo*
- Kyselina trifluoroctová (CF_3COOH , TFA), *Merck Millipore, Německo*

- Glycerol ($C_3H_8O_3$), *Sigma-Aldrich, USA*
- Kvasinkový extrakt, *Sigma-Aldrich, USA*
- Pepton, *Sigma-Aldrich, USA*
- Bacto-yeast nitrogen báze, *Sigma-Aldrich, USA*
- Biotin, *Sigma-Aldrich, USA*
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4), *Lachema, Česká republika*
- Chlorid sodný ($NaCl$), *Merck Millipore, Německo*
- Síran nikelnatý ($NiSO_4$), *Penta, Česká republika*
- Octan sodný (CH_3COONa), *Lachema, Česká republika*
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4), *Lachema, Česká republika*
- Histidin ($C_6H_9N_3O_2$), *Penta, Česká republika*
- Tris(kyselina chlorovodíková) (Tris-HCl), *Sigma-Aldrich, USA*
- Dithiotreitol (DTT), *Sigma-Aldrich, USA*
- Dodecylsíran sodný (SDS), *Serva, USA*
- Bromfenolová modř ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), *Merck Millipore, Německo*
- Glycin ($C_2H_5NO_2$), *Lachema, Česká republika*
- Kyselina octová (CH_3COOH), *Slavus, Slovenská republika*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R250), *Sigma-Aldrich, USA*
- Akrylamid ($CH_2=CHCONH_2$), *Sigma-Aldrich, USA*
- Peroxodisíran amonný $(NH_4)_2S_2O_8$, *Lachema, Česká republika*
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylendiamin), *Sigma-Aldrich, USA*
- Kyselina citronová ($C_6H_8O_7$), *Slavus, Slovenská republika*
- Citronan sodný ($C_6H_5Na_3O_7$), *Lachema, Česká republika*
- Laminarin (β -1,3-D-glukan, LAM), *Sigma-Aldrich, USA*
- Kyselina mravenčí ($HCOOH$), *Penta, Česká republika*
- Chelatační sepharóza fast flow (CHSFF), *Pharmacia, Švédsko*

3.3 Software

- ChemStation, *Agilent Technologies, USA*
- UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF, *Bruker Daltonics, Bremen, Německo*
- Flex Analysis, *Bruker Daltonics, Bremen, Německo*
- Flex Control, *Bruker Daltonics, Bremen, Německo*
- Chromeleon, *Dionex, USA*

3.4 Pomůcky

- Kádinky, odměrné válce, zkumavky, Petriho misky, MALDI destička (Anchorchip),
- vyvíjecí komory, vyvíjecí silikagelové destičky, skelná vata, lžičky,
- mikropipety, eppendorfký, očkovací klička, centriprep, pinzety,
- Erlenmeyerovy baňky, kultivační baňky, zátky, váhy, fén.

3.5 Fluorescenční značení oligosacharidů sulforodaminem

Složení reakční směsi

- 5 mg oligosacharidu
- 5 mg kyanoborohydritanu sodného
- 30 mg octanu amonného
- 100 μ l vody

Pracovní postup barvení

Sulforodaminem (SR) byly fluorescenčně značeny laminarioligosacharidy (Megazyme), β -1,3-laminaribióza (L2), β -1,3-laminaritrióza (L3), β -1,3-laminaritetraóza (L4), β -1,3-laminaripentaóza (L5), β -1,3-laminarihexaóza (L6), β -1,3-laminariheptaóza (L7). Ostatní značené oligosacharidy β -1,4-chitopentaóza-SR (CH5-SR), β -1,4-celopentaóza-SR (C5-SR), smíšený β -1,3/1,4-glukan-SR (MLG-SR), β -1,4-manotetraóza-SR (Mano-4-SR), β -1,6-pustulohexaóza-SR (P6-SR), xyloglukanheptaóza-SR (XGO7-SR), β -1,4-D-xylohexaóza-SR (X6-SR), α -1,4-maltopentaóza-SR (M5-SR), byly získány jako dar od doc. Ing. Vladimíra Farkaše, DrSc., z Chemického ústavu SAV, Bratislava.

Prvním krokem fluorescenčního značení oligosacharidů (OS) byla aminace. Reakční směs byla inkubována 4 hodiny při 80 °C. Po ukončení inkubace byl 1 μ l 10krát ředěné reakční směsi nanesen na silikagelovou destičku. Destička byla vyvíjena v systému n-propanol-methanol-voda v poměru 2 : 1 : 1. Poté byla provedena detekce orcinolem, čímž byla potvrzena přítomnost naaminovaných OS v reakční směsi, glykaminy zůstaly na startu.

Následovalo srážení reakční směsi 95% ethanolem, 10–15 min při –18°C. Vzniklá sraženina byla zcentrifugována (při 4 °C, 4 500 ot/min, 5 min) a následně promývána 90% ethanolem, až do doby, kdy v supernatantu nebyly přítomny amonné ionty, což bylo ověřeno negativní reakcí Nesslerovým činidlem.

Promytá sraženina z předchozího kroku byla rozpuštěna v 0,5 ml 3% tetraboritanu sodného a následoval samotný krok barvení přidáním 5 mg SR. V uzavřené zkumavce byla směs inkubována při pokojové teplotě po dobu 16 hod. Poté byl roztok pomocí acetonu vysrážen a zcentrifugován. Sraženina byla promývána acetonem až byl supernatant bezbarvý.

Produkt byl ze sraženiny vymyt 70% ethanolem, zcentrifugován a supernatant odložen. Tento postup byl opakován 3–4krát. Získané supernatanty byly spojeny, nanesený na silikagelovou destičku a pomocí metody TLC byla zkontrolována přítomnost produktů. Jako standard byla použita samotná barvička a jako mobilní fáze systém n-butanol-ethanol-voda v poměru 5 : 3 : 2. Detekce byla provedena pod UV světlem.

Spojené supernatanty byly do sucha zahuštěny na vakuové rotační odparce, odparek byl rozpuštěn ve 20% ethanolu a spektrofotometricky byla stanovená koncentrace při 566 nm.

Čistota barvených OS se SR byla analyzována hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF použitím systému UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF. Jako matrice byla použita kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (3 mg·ml⁻¹ v 60% acetonitrilu a 0,1% kyselině trifluoroctové).

Přímo na MALDI destičce byl smíchán 1 µl barveného OS (OS-SR) s 1 µl roztoku matrice. Měření bylo provedeno v pozitivním reflektrotronovém módu.

3.6 Exprese Phr2 proteinu *C. albicans* v *P. pastoris*

Klon exprimující Phr2 protein

Klon 39-29-16 kvasinky *P. pastoris* byl poskytnut Sbírkou kvasinek, Chemický ústav, SAV, Bratislava. Tento klon byl připraven týmem prof. Laury Popolo v Milánu, Itálie jako klon schopný exprese *PHR2*, jehož produkt, Phr2 protein, je produkován extracelulárně do média. Navíc je protein Phr2 opatřen histidinovým koncem, který má afinitu k niklu, což umožňuje purifikaci tohoto proteinu pomocí afinitní chromatografie.

3.6.1 Příprava médií

Glycerol-komplexní médium (MGY médium)

- 1% glycerol
- 1% kvasinkový extrakt
- 2% pepton
- 1,34% bacto-yeast nitrogen báza
- 4×10^{-5} % biotin

Bylo připraveno 50 ml MGY média a rovnoměrně rozděleno do 2 kultivačních baněk a médium bylo vysterilizováno 20 min při teplotě 120 °C a tlaku 120 kPa.

Methanol-komplexní médium (MMY médium)

- 0,5% methanol
- 1% kvasinkový extrakt
- 2% pepton
- 1,34% „bacto-yeast nitrogen báza“
- $4 \cdot 10^{-5}$ % biotin

0,5% methanol byl přidán až po sterilizaci média.

Bylo připraveno 360 ml MMY média a rovnoměrně rozděleno do 6 kultivačních baněk, médium bylo 20 min sterilizováno při teplotě 120 °C a tlaku 120 kPa.

3.6.2 Dialyzační pufr

Na 5 l fosfátového pufru bylo použito 24 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 46,8 g chloridu sodného, pH 8.

3.6.3 Proces exprese Phr2 proteinu

Ve sterilním boxu do vychlazeného růstového MGY média bylo naočkováno 1 plné očko kvasinky *P. pastoris*, klon 39-29-16. Růstová média byla přes noc kultivována při teplotě 30 °C, 220 rpm. Další den byla zkontrolována čistota kultury a část byla přeočkována do dalšího MGY média. Média byla přes noc kultivována na třepačce, při teplotě 30 °C, 220 rpm. Následující den byla média zcentrifugována, supernatant byl oddělen a kvasinky byly rozsuspendovány do 4 nových kultivačních baněk s produkčním MMY médiem. Kultivační baňky obsahovaly 0,5 % methanolu. Methanol byl přidán každých 24 hod. V čase 0 hod byl udělán odběr 200 µl. Odběr byl zcentrifugován a supernatant byl zamražením uskladněn. Stejným způsobem byly provedeny odběry v čase 24, 48 a 72 hod.

Po 72 hodinách inkubace byly obsahy všech kultivačních baněk zcentrifugovány (při 4 °C, 3 000 ot/min, 10 min), bylo získáno přibližně 240 ml supernatantu a supernatanty se 24 hod dialyzovaly proti fosfátovému pufru. Další den byl pomocí centriprepu zmenšen objem média na 15 ml. Následovalo přečištění Phr2 proteinu pomocí chelatační sepharózy.

3.6.4 Purifikace rekombinantních proteinů na CHSFF

Použité roztoky

- Roztok A: 0,1 mol·l⁻¹ roztok síranu nikelnatého v destilované vodě
- Kyselý pufr: 0,02 mol·l⁻¹ octan sodný, 0,5 mol·l⁻¹ chlorid sodný, pH 4
- Vazebný pufr: 50 mmol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný, 0,2 mol·l⁻¹ chlorid sodný, 3 mmol·l⁻¹ histidin, pH 7,4–8
- Promývací pufr: stejné složení jako vazebný pufr
- Eluční pufr: 50 mmol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný, 0,2 mol·l⁻¹ chlorid sodný, 200 mmol·l⁻¹ histidin, pH 7,4–8

Pracovní postup

Adekvátní množství CHSFF bylo přeneseno na kolonku. Kolonka byla promyta dvojnásobným objemem vody a bylo na ni nanášeno poloviční objemové množství roztoku A. Aby poté byly odstraněny nadbytečné ionty Ni²⁺, kolonka byla promyta 5ti násobným objemem vody. Dále byla kolonka kontinuálně promývána 5ti násobným objemovým množstvím kyselého pufru. V tomto kroku byly odstraněny slabě vázané ionty Ni²⁺. Dalším krokem byla ekvibrace kolonky s nejméně dvojnásobným objemem vazebného pufru.

Následně byly 3 ml nabitě CHSFF přidány na 15 ml zdialyzovaného a zahuštěného média a tato směs byla 30 min při teplotě 4 °C míchána na kolotoči. Dále byla provedena centrifugace (500 ot/min, 2–5 min) a supernatant byl uskladněn. V šestinásobném množství byl k sedimentu přidán promývací pufr, roztok byl 5 min míchán na kolotoči, byla provedena centrifugace (500 ot/min, 5 min) a supernatant byl uschován pro pozdější elektroforézu. Tento krok byl 2krát zopakován. Poté bylo přidáno dvojnásobné množství elučního pufru, roztok byl 5 min míchán na kolotoči, zcentrifugován (500 ot/min, 5 min) a supernatant s obsahem

žádaného proteinu byl uchován. Tento krok byl proveden 4krát. Na závěr byla přítomnost proteinu v elučním pufru prokázána měřením absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm. Přítomnost proteinů byla následně ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Koncentrace proteinu Phr2 byla stanovena Lowryho metodou.

3.7 Elektroforéza SDS-PAGE

Použité roztoky

- Laemmliho pufr: $62,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DTT, 25% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř
- Running pufr: $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,3, $192 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glycín, 0,1% SDS
- Fixační roztok: 45,4 % ethanolu, 50 % vody, 4,6 % kyseliny octové
- Coomassie blue barvicí roztok: 180 ml methanolu, 180 ml vody, 40 ml kyseliny octové, 0,5 g CBB R250
- Odbarvovací roztok: 12,5 % ethanolu, 77,5 % vody, 10,0 % kyseliny octové

Pracovní postup

Byla složena aparatura na elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a podle tabulky 1 byl připraven separační gel.

Tabulka 1: Složení 8% separačního gelu

Složka	Objem
30% akrylamid	1,35 ml
$1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris pufr, pH 8,8	1,25 ml
10% SDS	50,00 μl
voda	2,37 ml
1% peroxodisíran amonný	25,00 μl
TEMED	2,50 μl
celkový objem	5,047 5 ml

Separací gel, který byl nalit mezi sklička elektroforetické aparatury, byl převrstven 2 ml 96% ethanolu. Po ztuhnutí gelu byl ethanol odstraněn a nalit startovací gel, který byl připraven podle tabulky 2. Do vrchního gelu byl zanořen hřeben a gel byl odložen, aby zaschl.

Tabulka 2: Složení 8% startovacího gelu

Složka	Objem
30% akrylamid	325,0 μ l
1,5 mol·l ⁻¹ Tris pufr, pH 6,8	625,0 μ l
10% SDS	25,0 μ l
voda	1,5 ml
10% peroxodisíran amonný	12,5 μ l
TEMED	2,5 μ l
celkový objem	2,502 5 ml

Po zaschnutí startovacího gelu byl gel upevněn do aparatury a nalit roztok, ve kterém běžela elektroforéza (running pufr). Poté byl z gelu vytažen hřebínek a do „jamek“ od hřebenu byly nanесeny vzorky vypurifikovaného Phr2 proteinu, jednotlivé frakce z promývání proteinu, vzorek po dialýze, vzorky po odběrech v čase 0–72 hod a vzorek standardu pro odečtení molekulové hmotnosti. Jednotlivé vzorky byly denaturovány přidáním Laemmliho pufru (5 μ l vzorku a 10 μ l pufru) a povařením po dobu 5 min.

Elektroforéza běžela při konstantním proudu 180 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a 1 hod byl promýván ve fixačním roztoku, poté 1 hod v barvicím roztoku a na závěr přes noc v odbarvovacím roztoku.

3.8 Testování aktivity Phr2 proteinu

3.8.1 pH optimum Phr2p

Pomocí 0,1 mol·l⁻¹ citrátového pufru s různými hodnotami pH, který byl připraven z 0,1 mol·l⁻¹ kyseliny citronové a 0,1 mol·l⁻¹ citranu sodného, bylo testováno pH optimum vyizolovaného Phr2 proteinu.

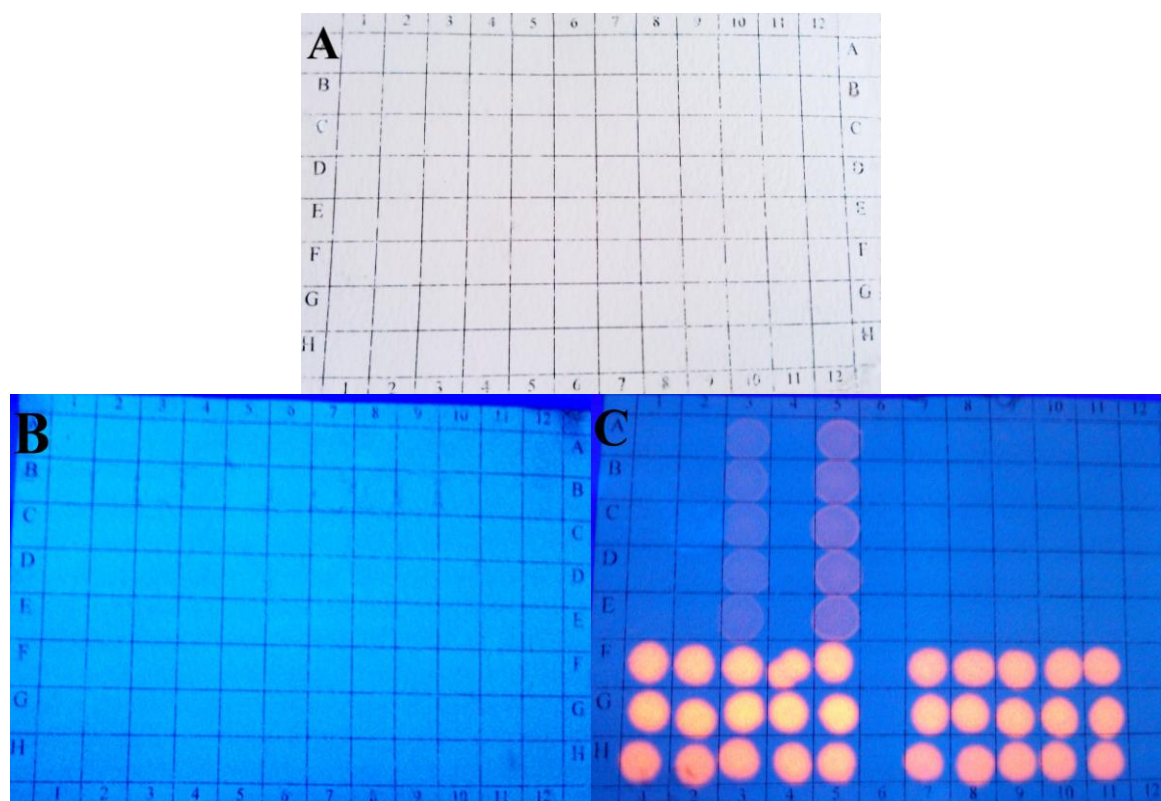
Použité roztoky

- 300 μ mol·l⁻¹ L6-SR, 200 μ g·ml⁻¹ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 mol·l⁻¹ citrátový pufr pH (1,5–7,4)
- Blank: 300 μ mol·l⁻¹ L6-SR, voda, 1% laminarin, 0,1 mol·l⁻¹ citrátový pufr pH (1,5–7,4)
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala 30 μ mol·l⁻¹ L6-SR, 4 μ g Phr2p, 0,25% laminarin, 0,1 mol·l⁻¹ citrátový pufr pH 1,5; 2,5; 3; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,4. V blanku byl enzym nahrazen vodou. Po celý průběh reakce byla teplota 30 °C. V čase 0, 1, 3 a 5 hod bylo z reakčních směsí

a blanku odebráno 20 μl vzorku do 20 μl 20% kyseliny mravenčí. Odebrané vzorky pak byly nanесeny na celulóзовou matrici (obrázek 10A) v pěti paralelních nanáškách (5x5 μl) a matrice byla přes noc promývána v promývacím roztoku. Poté byl promývací roztok vyměněn za roztok 66% ethanolu a v tomto roztoku byla matrice promývána 1 hod. Matrice byla vysušena, umístěna mezi dvě skleněné tabulky a fluorescence byla měřena pomocí Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader s fluorescenčním detektorem a filtry s excitační vlnovou délkou 530 nm a emisní délkou 575 nm. Při negativní reakci (obrázek 10B), kdy fluorescenční detektor nezaznamenal žádný signál, matrice pod UV světlem nesvítila. Naopak vzorky, které vykazují aktivitu (obrázek 10C), pod UV detektorem svítily. Transglykozylační aktivita měřená papírovou metodou je vyjádřena ve fluorescenčních jednotkách (F. U.) jako rozdíl fluorescence mezi vzorkem a kontrolou.



Obrázek 10 A–C: A: celulóзовá matrice, B: negativní výsledek, C: pozitivní výsledek

3.8.2 Teplotní optimum Phr2p

Bylo testováno teplotní optimum vyizolovaného Phr2 proteinu při optimálním pH proteinu Phr2 zjištěném v předchozí kapitole.

Použité roztoky

- 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Blank: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, voda, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, $4 \mu\text{g}$ Phr2p, 0,25% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. V blanku byl enzym nahrazen vodou. Optimální teplota byla testována při 25, 30, 35, 40 a 45 °C. V čase 0, 1, 3, 5 hod bylo z reakčních směsí a blanku odebráno 20 μl vzorku do 20 μl 20% kyseliny mravenčí. Dále byl postup shodný s postupem při zjišťování pH optima v kapitole 3.8.1.

3.8.3 Substrátová specifita Phr2p

3.8.3.1 Testování substrátové specifity pomocí fluorescenční papírové metody

Použité roztoky

- $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OS-SR, $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Blank: $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OS-SR, voda, 1% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Použité oligosacharidy (OS) jako substráty

- CH5-SR
- C5-SR
- MLG-SR
- Mano-4-SR
- P6-SR
- XGO7-SR
- X6-SR
- M5-SR
- L7-SR

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OS-SR, $4 \mu\text{g}$ Phr2p, 0,25% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. V blanku byl enzym nahrazen vodou. V čase 0, 1, 3 hod bylo z reakčních směsí a blanku odebráno 20 μl vzorku do 20 μl 20% kyseliny mravenčí. Směs byla inkubována při teplotě 30 °C. Další pracovní postup byl shodný s postupem při zjišťování pH optima v kapitole 3.8.1. Výsledky substrátové specifity byly ověřeny pomocí HPLC analýzy.

3.8.3.1 Testování substrátové specifity pomocí metody HPLC

Použité roztoky

- 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OS-SR 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octan amonný pH 5,7

Použité oligosacharidy jako substráty

- MLG-SR
- X6-SR
- L6-SR

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OS-SR, 4 μg Phr2p, 0,25% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. Směs byla inkubována při teplotě 30 °C, v čase 0, 1, 3, 5 a 16 hod byla provedena HPLC analýza 50 μl vzorku.

Pro kontrolní analýzy byla použita metoda HPLC s použitím isokratické vylučovací chromatografie na Hewlett Packard 1100, systém s fluorescenčním detektorem kontrolovaným Chromeleon softwarem. Detektor byl naprogramován na excitaci při 530 nm a emisi při 575 nm. Analýza byla prováděna při 30 °C na koloně TSKgel G3000 SWXL, 7,8 mm x 300 mm. Jako eluční činidlo byl použit 100 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octan amonný (pH 5,7) s průtokovou rychlostí 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, který obsahoval 20% acetonitril.

3.8.4 Donorová specifita Phr2p

Použité roztoky

- 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% roztoky polysacharidů (donorů), 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Blank: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, voda, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Použité donory

Veškeré polysacharidy, které byly použity jako donory, byly získány darem od doc. Ing. Vladimíra Farkaše, DrSC. z Chemického ústavu SAV v Bratislavě.

- 1% β -1,4-karboxymethyl-celulóza (CM-celulóza), 1% β -1,4-D-xylan,
- 1% β -1,4-hydroxymethyl-celulóza (HE-celulóza), 1% β -1,4-xyloglukan,
- 1% β -1,4-karboxymethyl-glukan (CM-glukan), 1% β -1,4-xylan z buku,
- 1% β -1,4-chitosan, 1% β -1,3-laminarin, 1% β -1,4-karboxymethyl-chitin (CM-chitin),
- 1% β -1,3/1,4-kvasinkový β -glukan, 1% β -1,6-pustulan,
- 1% směsný β -1,3/1,4-glukan, 1% β -1,3/1,6-galaktomanan.

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, $4 \mu\text{g}$ Phr2p, 0,25% donor, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. V blanku byl enzym nahrazen vodou. V čase 0, 1 a 3 hod byly provedeny odběry $20 \mu\text{l}$ vzorku do $20 \mu\text{l}$ 20% kyseliny mravenčí. Směs byla inkubována při teplotě 30°C . Další pracovní postup byl shodný s postupem při zjišťování pH optima v kapitole 3.8.1.

3.8.5 Závislost aktivity Phr2p na délce řetězce akceptoru

Byla zjišťována závislost aktivity Phr2p na délce řetězce akceptoru. Jako akceptory byly použity různě dlouhé řetězce OS-SR laminarinu (L2-SR, L3-SR, L4-SR, L5-SR, L6-SR, L7-SR).

Použité roztoky

- $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L2–L7-SR, $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Blank: $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, voda, 1% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L2–L7-SR, $4 \mu\text{g}$ Phr2p, 0,25% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. V blanku byl enzym nahrazen vodou. Odběry $20 \mu\text{l}$ vzorku do $20 \mu\text{l}$ 20% kyseliny mravenčí byly provedeny v čase 0, 1, 3 a 5 hod. Směs byla inkubována při teplotě 30°C . Další pracovní postup byl shodný s postupem při zjišťování pH optima v kapitole 3.8.1.

3.8.6 Koncentrační závislost aktivity Phr2p

Pro určení aktivity Phr2p byly použity roztoky s různým obsahem Phr2 v reakční směsi, a to 1,25; 3,13; 6,25; 8,75; 12,50; 18,75; 25,00; 37,50; 50,00; 62,50; 93,75 a $125,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Použité roztoky

- $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Blank: $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, voda, 1% laminarin, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Pracovní postup

Reakční směs obsahovala 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 0,1; 0,25; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 7,5; 10,0 μg Phr2p, 0,25% laminarin a 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. V blanku byl enzym nahrazen vodou. Odběry vzorků 20 μl do 20 μl 20% kyseliny mravenčí byly provedeny v čase 0, 1 a 3 hod. Směs byla inkubována při teplotě 30 °C. Další pracovní postup byl shodný s postupem při zjišťování pH optima v kapitole 3.8.1.

3.8.7 Teplotní stabilita Phr2p

Použité roztoky

- 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Blank: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, voda, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3
- Promývací roztok: 66% ethanol, 5% kyselina mravenčí

Pracovní postup

Phr2 protein byl zahříván při 95 °C a v čase 0, 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min bylo odebráno 35 μl vzorku. Z takto připraveného proteinu pak bylo 30 μl použito do reakční směsi. Reakční směs obsahovala 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 4 μg tepelně inaktivované Phr2p, 0,25% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3. Eppendorfký s reakční směsí a blankem byly udržovány při konstantní teplotě 30 °C. Odběry 20 μl vzorku do 20 μl 20% kyseliny mravenčí byly provedeny v čase 0, 1 a 3 hod. Dále se pokračovalo podle pracovního postupu při zjišťování pH optima v kapitole 3.8.1.

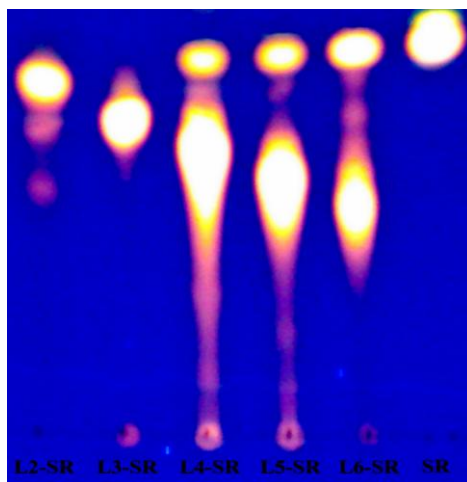
3.9 Analýza produktů transglykozylační reakce katalyzované Phr2p

Reakční směs obsahovala 0,25% laminarin, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L5-SR, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr, pH 3, 4 μg proteinu Phr2. Směs byla inkubována při teplotě 30 °C po dobu 16 hod. Následně byla inkubační směs nanášena na preparativní TLC destičku s 0,5 mm vrstvou silikagelu 60 layer a destička byla dvakrát vyvíjena v systému n-butanol-ethanol-voda v poměru 5 : 3 : 2. Hlavní fluorescenční zóny (P1)–(P4) korespondující s L5-SR a hybridními produkty byly lokalizovány pod UV světlem, následně tyto zóny byly vyškrábány z TLC destičky a eluovány 20% ethanolem. Eluáty byly analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF použitím systému UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF. Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 60% acetonitrilu a 0,1% trifluorooctové kyselině) byla použita jako MALDI matrice. 1 μl eluátu byl smíšen s 1 μl roztoku matrice přímo na MALDI destičce (Anchorchip). Měření probíhalo v pozitivním reflektorném módu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

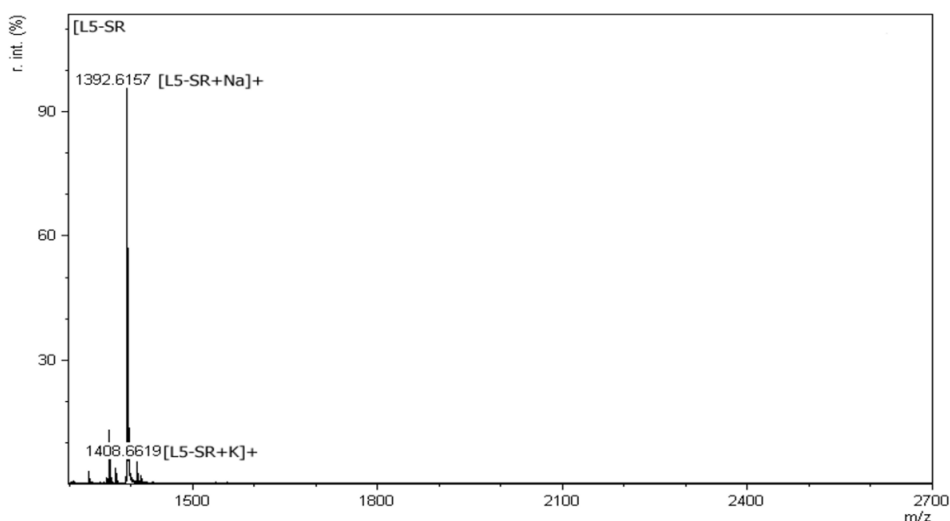
4.1 Značení oligosacharidů OS-SR

Oligosacharidy L2–L7-SR byly značeny SR podle postupu v kapitole 3.5. Kontrola čistoty označených OS byla provedena pomocí TLC. Na obrázku 11 vidíme značené OS L2–L7-SR. Pro kontrolu byl vedle vzorku nanesen samotný SR, který byl mobilní fází posunut o něco výše než barvené substráty.



Obrázek 11: TLC destička po vyvíjení v systému n-butanol-ethanol-voda (5 : 3 : 2) s naneseným označeným oligosacharidem L3-SR a sulforodaminem

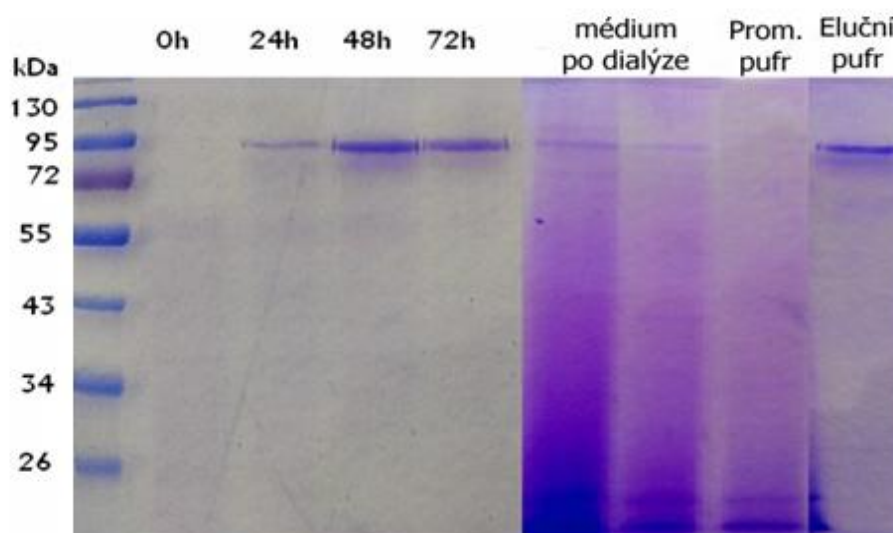
Kontrola čistoty fluorescenčně označených oligosacharidů byla analyzována na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF, s použitím systému FlexAnalysis. Jako příklad je uveden OS L5-SR. Na obrázku 12 vidíme, že produkt obsahoval pouze námi značený OS L5-SR(Na^+) o molární hmotnosti $1\,392,615\,7\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Stejným způsobem byly analyzovány ostatní značené laminari-OS-SR.



Obrázek 12: Kontrola čistoty L5-SR na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF

4.2 Exprese a purifikace Phr2p

Pomocí SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy byla podle návodu v kapitole 3.7 zkontrolována čistota jednotlivých vzorků. Na obrázku 13 vidíme, že vzorek po odběru v čase 0 hod, neobsahuje žádný protein. Ten byl zaznamenán až v následujícím odběru po 24 hodinách. Podle výraznosti bendů, můžeme říci, že s každým odběrem je ve vzorku více Phr2 proteinu, s časem se tedy jeho obsah v médiu zvyšuje. Vzorek po dialýze kromě daného proteinu obsahuje velké množství jiných látek (obrázek 13). Tyto látky byly odstraněny zahuštěním na centriprep, který obsahuje membránu, přes kterou difundují nízkomolekulární látky do 30 kDa a vysokomolekulární látky se zakoncentrují. Další purifikace Phr2 proteinu byla provedena na chelatační sepharóze nabitě niklem. Phr2 protein byl histidinovým koncem zadržován v koloně navázáním na Ni^{2+} , zatímco znečišťující složky byly vymyty promývacím pufr. V promývacím pufru podle očekávání není Phr2 protein (obrázek 13). Phr2p byl z kolony vymyt elučním pufr. Phr2p je pouze v elučním pufru (obrázek 13), co dokazuje správnost purifikace. Molární hmotnost Phr2 proteinu je přibližně 92 kDa.



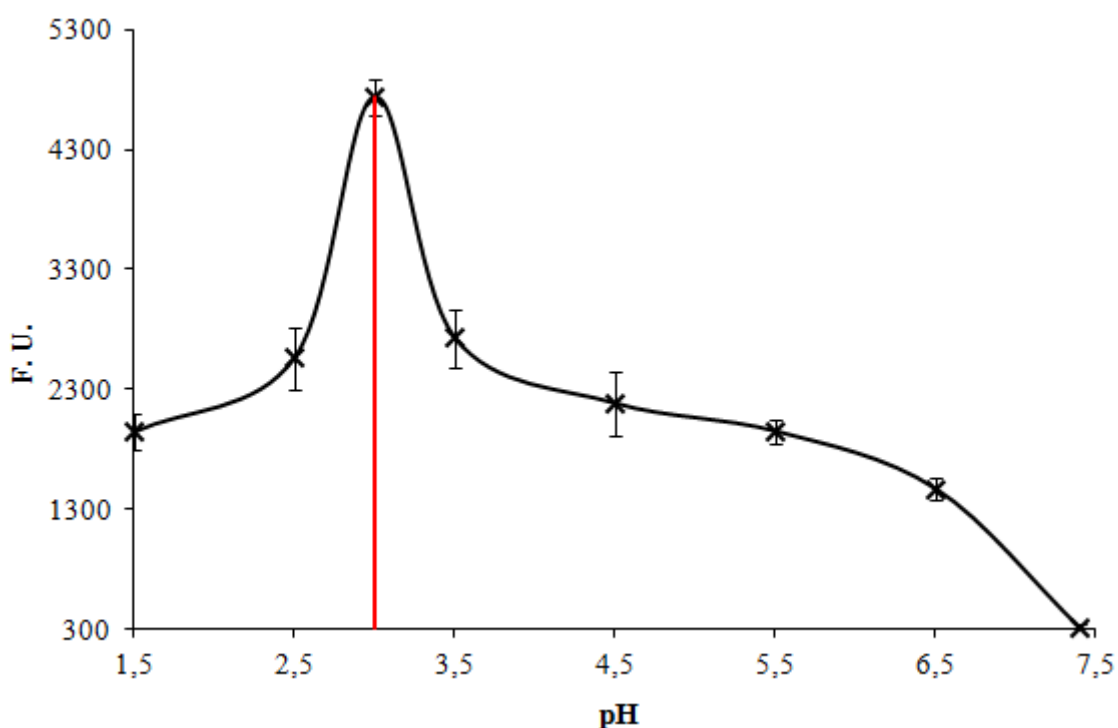
Obrázek 13: Gel po elektroforéze SDS-PAGE

4.3 Testování transglykozylační aktivity proteinu Phr2

Na testování transglykozylační aktivity Phr2p byly použity značené OS-SR. Metoda založená na barvení oligosacharidů fluorescenčními značkami, uvedená v kapitole 2.4.4, je již běžně využívanou metodou. Celou přípravu fluorescenčních substrátů v roce 2008 zjednodušili Kosík a Farkaš. Postup testování aktivity proteinu byl proveden podle postupů uvedených v kapitole 3.8.

4.3.1 pH optimum Phr2p

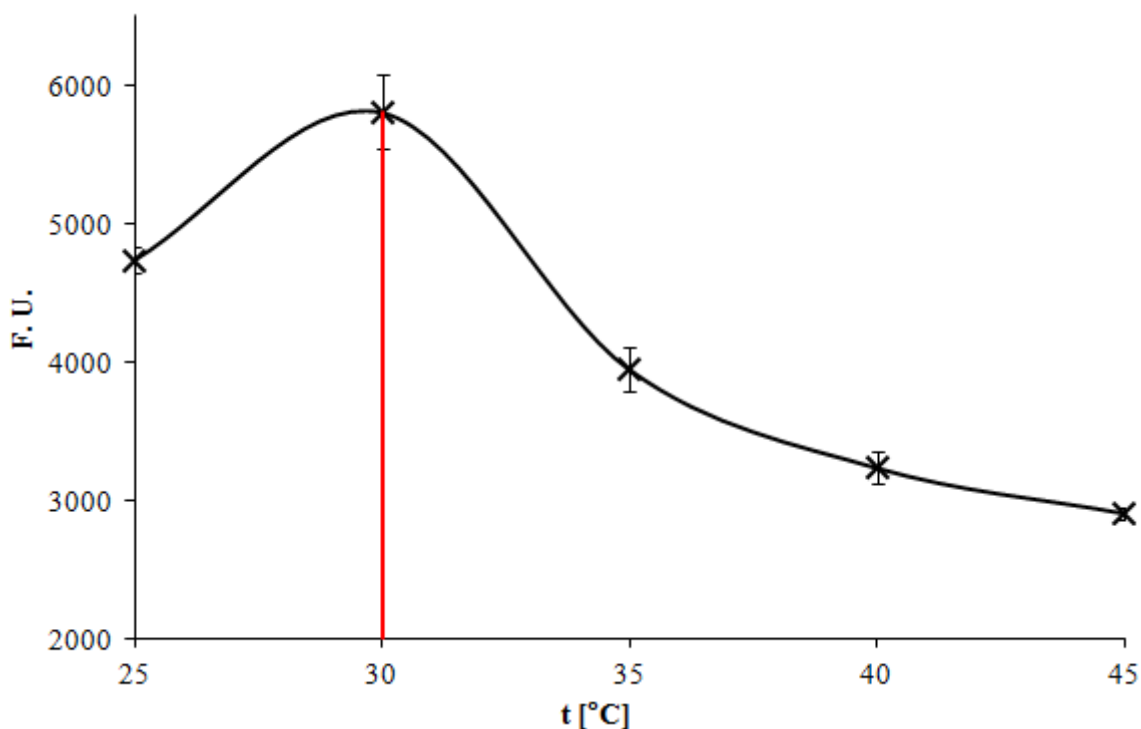
Podle postupu v kapitole 3.8.1 bylo testováno optimální pH Phr2 proteinu. V experimentu byl jako akceptor použit OS L6-SR, jako donor 0,25% laminarin. Dále byl použit citrátový pufr s pH v rozmezí 1,5–7,4. Odběry z reakčních směsí a nanášky na celulóзовou matrici byly provedeny v čase 0, 1, 3 a 5 hod. Po vyhodnocení výsledků experimentu pro optimální pH proteinu Phr2 vyplývá, že pH optimum stanovovaného proteinu je pH 3. Avšak z obrázku 14 vyplývá, že Phr2 protein vykazuje transglykozylační aktivitu v širším rozsahu pH v kyselé oblasti. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.1.1, regulace exprese Phr proteinů silně ovlivněna pH okolního prostředí a exprese Phr2 probíhá, pokud je pH 5,5 nebo nižší. Výsledek tedy dopadl podle očekávání. Při dalších experimentech se dále pracovalo s citrátovým pufrům pH 3.



Obrázek 14: pH optimum Phr2p po 5 hod inkubace s L6-SR, inkubace při teplotě 30 °C, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH (1,5–7,4), vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

4.3.2 Teplotní optimum Phr2p

Reakční směs, která obsahovala L6-SR jako akceptor, 0,25% laminarin jako donor, Phr2p a citrátový pufr pH 3, byla zahřívána v teplotním rozmezí 25–45 °C. Odběry z reakčních směsí v čase 0, 1, 3 a 5 hod, byly následně nanášeny na celulóзовou matrici. Po vyhodnocení výsledků experimentu pro teplotní optimum Phr2p je patrné, že nejvyšší aktivitu daný protein má při teplotě 30 °C (obrázek 15). Phr2 protein vykazuje aktivitu i při jiných teplotách, nicméně rychlost transglykozylace není tak vysoká. Další testování transglykolyzační aktivity Phr2p bylo prováděno při této stanovené teplotě 30 °C.

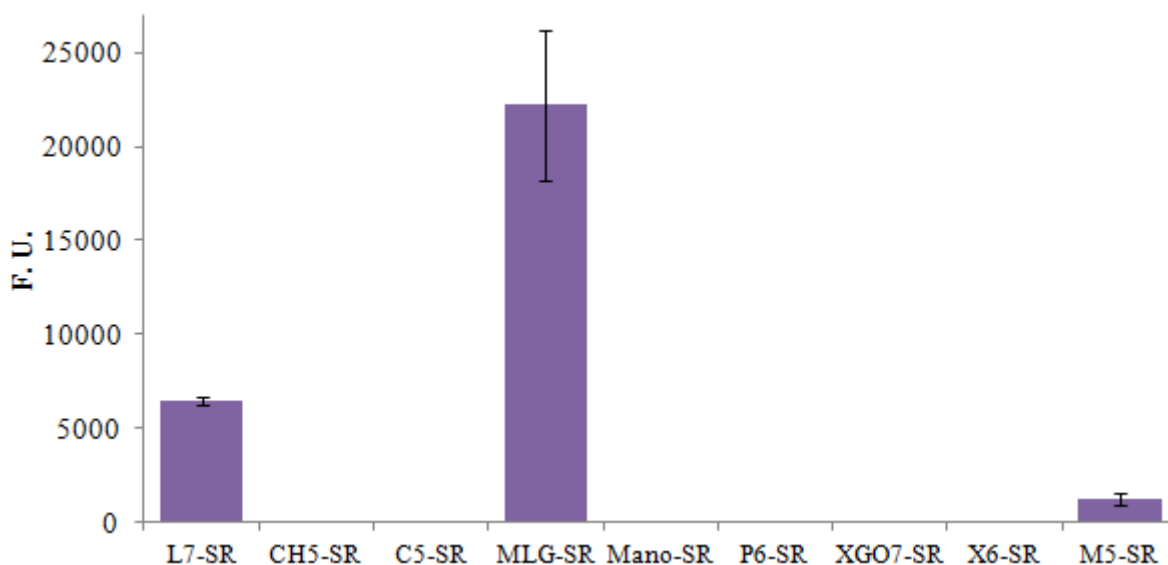


Obrázek 15: Teplotní optimum Phr2p po 3 hod inkubace s L5-SR, teplota 4; 20; 30; 37; a 45 °C, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

4.3.3 Substrátová specifita Phr2p

4.3.3.1 Testování substrátové specifity Phr2p papírovou fluorescenční metodou

Podle papírové fluorescenční metody vyplývá, že nejvhodnějšími akceptory pro transglykozylační reakci katalyzovanou Phr2p jsou β -1,3-vázané laminari-OS-SR (L7-SR) (obrázek 16). U dalších akceptorů (C5-SR, CH5-SR, Mano-SR, XGO7-SR a X6-SR), které mají glukózové jednotky vázané β -1,4-vazbou a P6-SR, což je β -1,6-vázaný OS, nebyla pozorována žádná aktivita. Překvapením pro nás byl OS MLG-SR. Tento OS obsahuje smíšené β -1,3/1,4- vazby, a proto jsme předpokládali, že by teoreticky mohl sloužit jako akceptor pro Phr2p. Byla však pozorována vysoká afinita samotného MLG-SR k papírové matici, proto je odvážné tvrdit, že by mohl sloužit jako akceptor. Pro potvrzení, zda se MLG-SR v transglykozylačních reakcích chová jako akceptor, byla provedena HPLC analýza, která je popsána v následující kapitole 4.3.3.2.

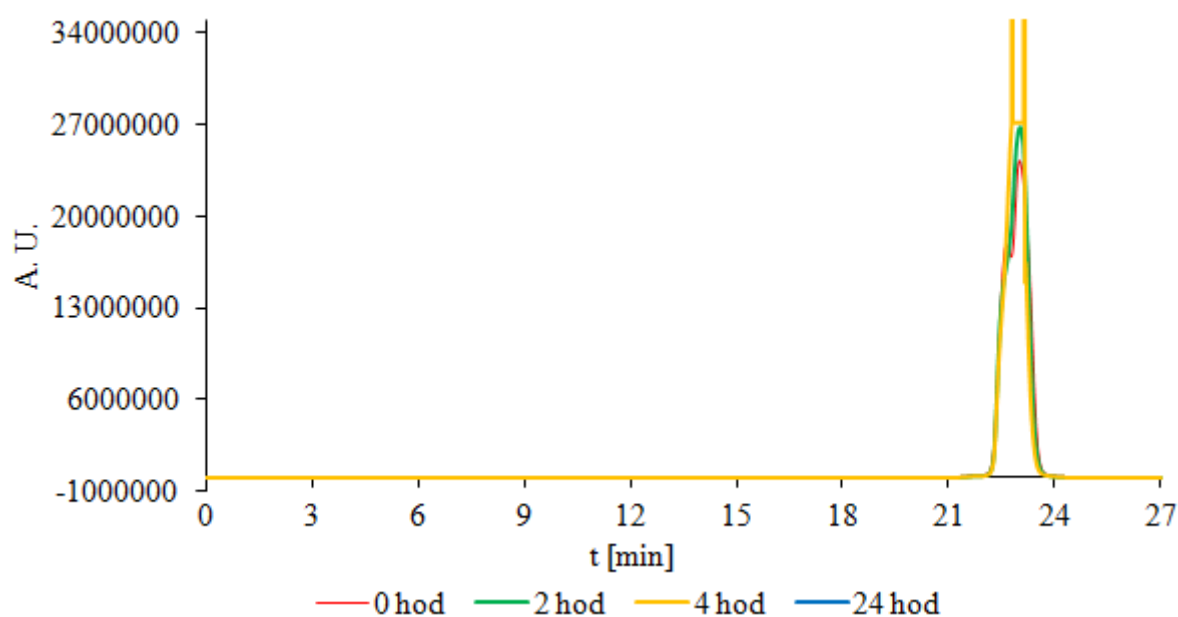


Obrázek 16: Aktivita Phr2 s různými fluorescenčně značenými OS po 3 hod inkubace. Inkubace při teplotě 30 °C, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OS-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

4.3.3.2 Testování substrátové specifity Phr2p pomocí HPLC

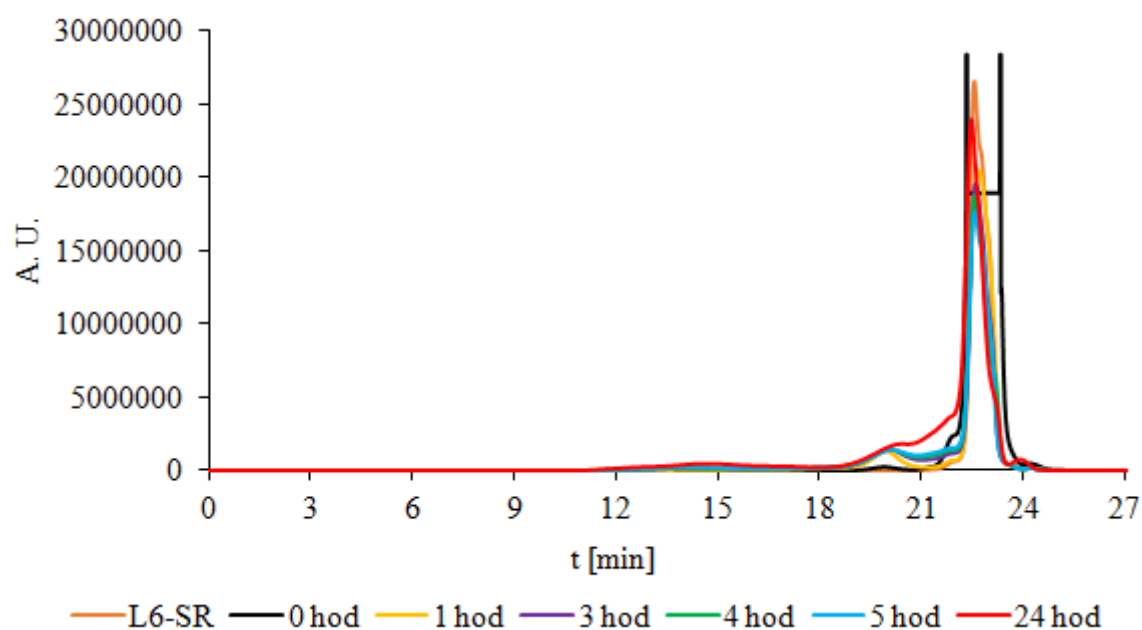
Jak je uvedeno v kapitole 4.3.3.1, pro ověření substrátové specifity Phr2p byla provedena HPLC analýza. Byl testován OS Mano-SR, u kterého při testování substrátové specifity papírovou fluorescenční metodou, nebyla zjištěna žádná aktivita, laminari-OS-SR (L6-SR) a MLG-SR, které aktivitu při fluorescenční papírové metodě vykazovaly. Na rozlišení akceptoru (OS-SR) a produktu transglykozylační reakce byla použita kolona pracující na principu molekulového síta, tedy větší, těžší molekuly (produkty) jsou z kolony eluovány dříve, menší později (akceptor).

Jak ukazuje obrázek 17, vzorek oligosacharidu Mano-SR podrobený HPLC analýze obsahoval pouze substrát, který je na obrázku 17 zaregistrován v čase 23 min, nikoliv produkt.

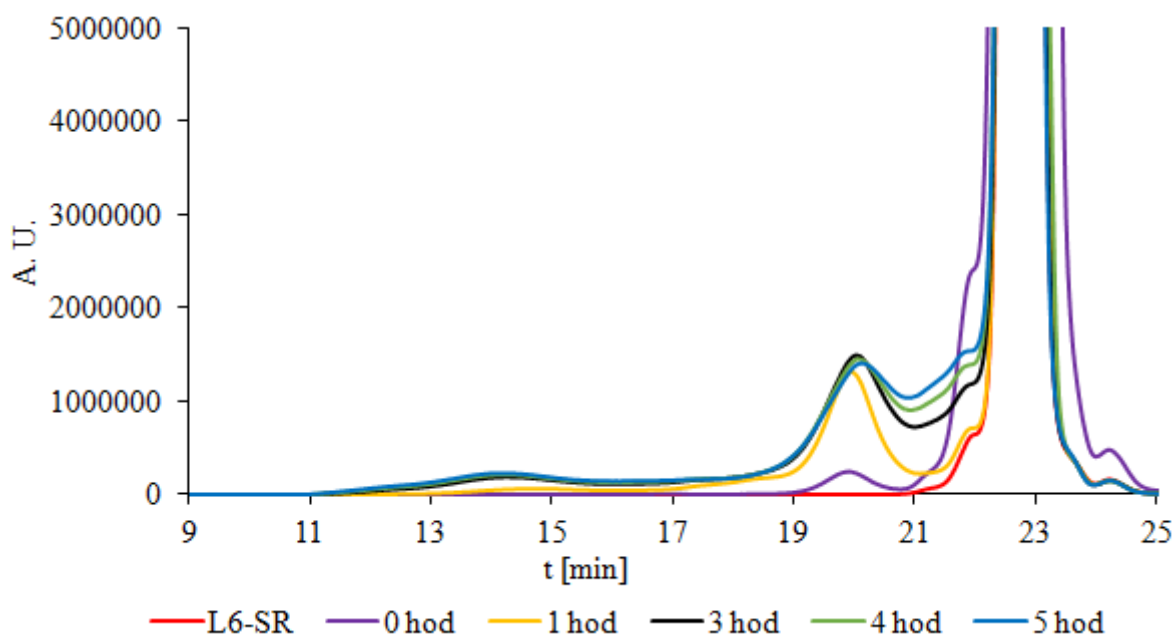


Obrázek 17: Chromatogram oligosacharidu Mano-SR po HPLC analýze

U L6-SR (obrázek 18 a obrázek 19) byly kromě substrátu zaznamenány i produkty. Pro lepší přehlednost, byl chromatogram L6-SR přiblížen (obrázek 19). Vidíme, že produkty byly zaregistrovány v časech 14 a 20 min, v čase 23 min z kolony vycházel samotný substrát L6-SR.

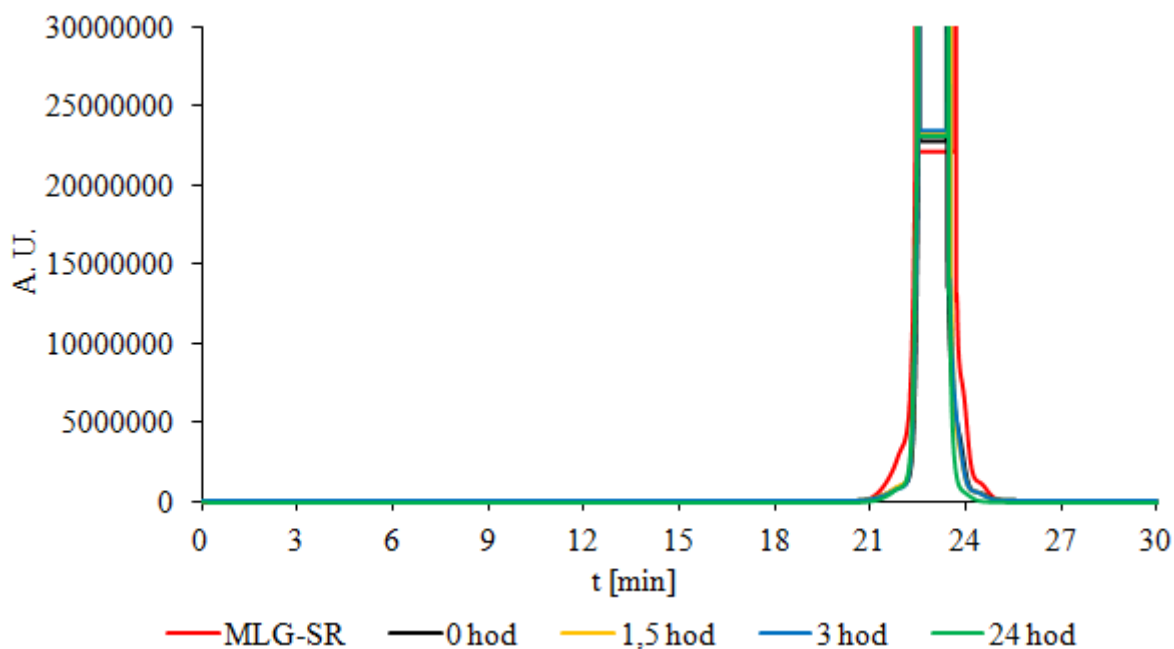


Obrázek 18: Chromatogram oligosacharidu L6-SR po HPLC analýze



Obrázek 19: Přibližný chromatogram oligosacharidu L6-SR po HPLC analýze

U OS MLG-SR byl zaznamenán obdobný chromatogram jako u OS Mano-SR (obrázek 20), kdy byl v čase 23 min zaznamenán pouze substrát. Z tohoto důvodu se domníváme, že substrátem jsou pouze laminari-OS.

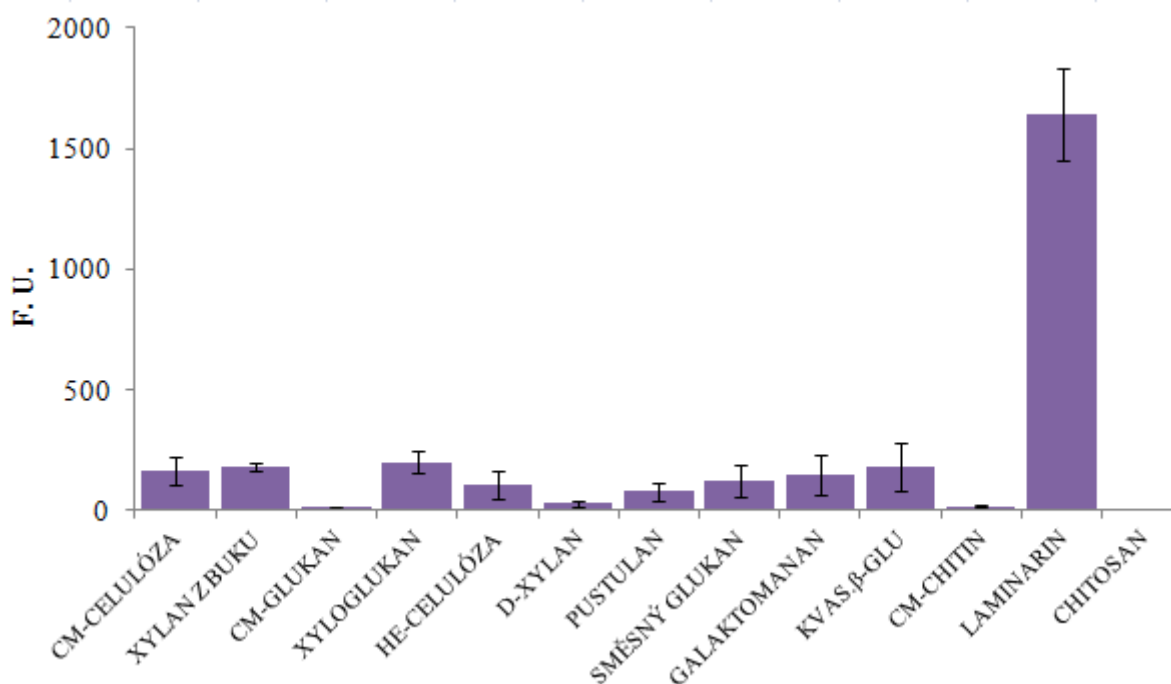


Obrázek 20: Chromatogram oligosacharidu MLG-SR po HPLC analýze

4.3.4 Donorová specifita Phr2p

V testu na donorovou specifitu byl jako akceptor použit OS L6-SR. Z naměřených výsledků vyplývá, že nejvhodnější donor pro transglykozylační reakci je laminarin (obrázek 21), což je lineární, ve vodě rozpustný polymer, jako jediný z testovaných polysacharidů vázaný β -1,3-vazbou. Další testované donory (CM-celulóza, xylan z buku, CM-glukan, xyloglukan, HE-celulóza, D-xylan, CM-chitin a chitosan) obsahovaly β -1,4-vazbu, pustulan má glukózové jednotky navázané β -1,6-vazbou, galaktomanan obsahuje smíšenou β -1,4/1,6-vazbu, kvasinkový β -glukan je vázán β -1,3/1,4-vazbou a směsný glukan obsahuje β -1,3/1,6-vazbu. Právě kvůli vazbě, kterou jsou jednotlivé polysacharidy tvořeny, neslouží jako donory při transglykozylačních reakcích katalyzovaných Phr2p.

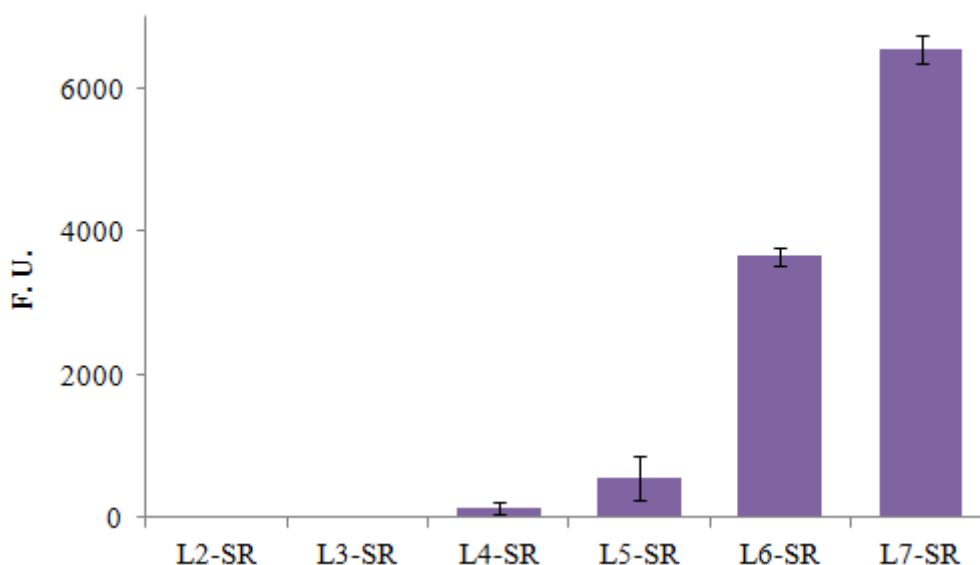
Získaný výsledek substrátové i donorové specifity koresponduje s teorií, která říká, že Phr proteiny jsou analogy Gas proteinů a jsou tedy schopné homotransglykozylačního přenosu části molekuly β -1,3-glukanu na jinou molekulu β -1,3-glukanu.



Obrázek 21: Aktivita Phr2 s různými donory po 3 hod inkubace, inkubace při teplotě 30 °C, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% roztoky polysacharidů (donorů), 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

4.3.5 Závislost aktivity Phr2 proteinu na délce řetězce akceptoru

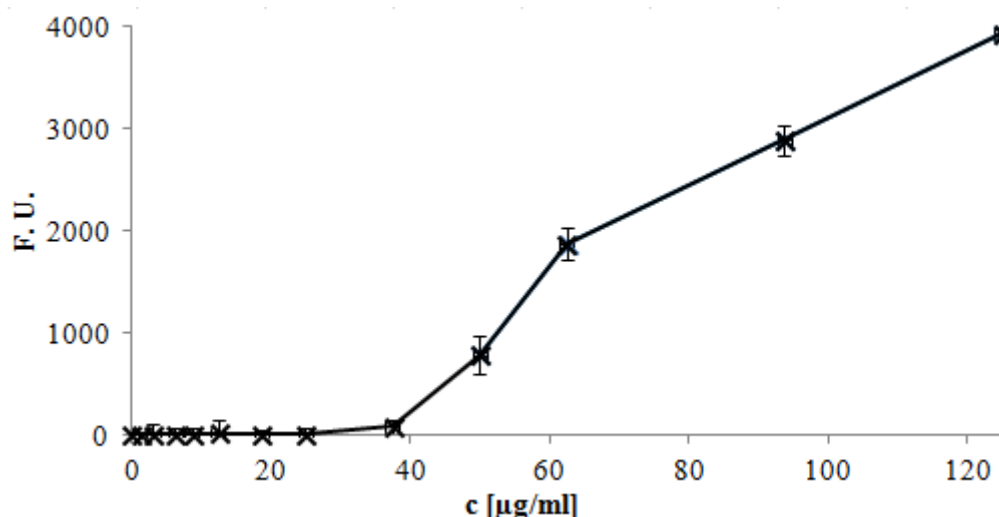
Transglykozylační aktivita Phr2p v závislosti na délce řetězce akceptoru byla testována s OS-SR laminarinu o délce 2–7 glukózových jednotek. Jak ukazuje následující obrázek 22, s rostoucím počtem glukozů v řetězci laminarinu logicky stoupala i aktivita proteinu. Phr2p největší aktivity dosahoval s nejdelším řetězcem, tedy v našem případě L7-SR. Z výsledku vyplývá, že OS musí obsahovat minimálně 5 glukózových jednotek vázaných β -1,3-vazbou, aby mohl sloužit jako akceptor pro Phr2 protein.



Obrázek 22: Aktivita Phr2p v závislosti na délce řetězce akceptoru po 5 hod inkubace při teplotě 30 °C, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L2–L7-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

4.3.6 Koncentrační závislost Phr2p

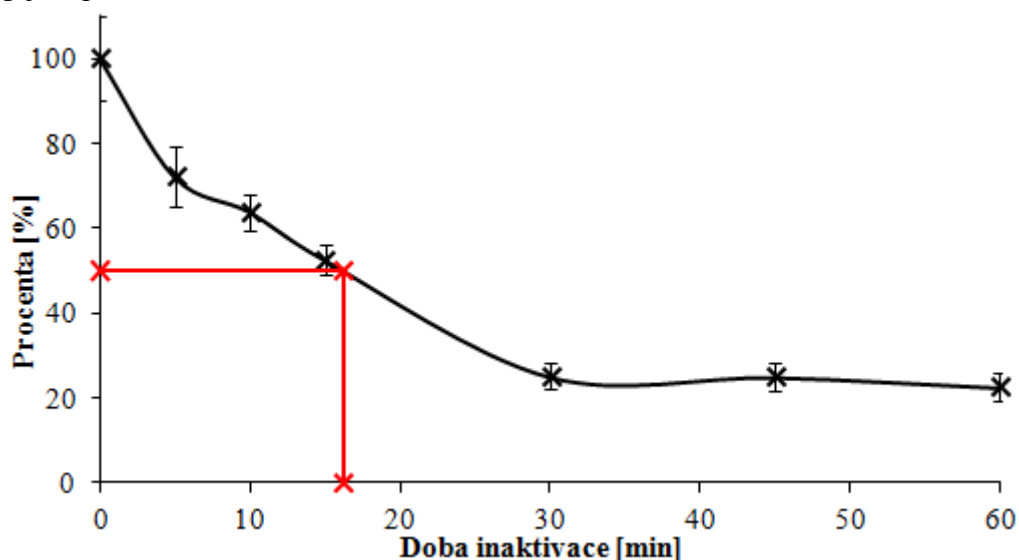
Pro určení aktivity Phr2p v závislosti na různých koncentracích Phr2p, byl jako donor použit 1% laminarin, u něhož byla zaznamenána nejvyšší donorová aktivita (viz kapitola 4.3.4). Při zvyšování koncentrace proteinu Phr2 roste i rychlost transglykozylace katalyzované tímto enzymem. Z obrázku 23 je patrné, že při malém množství proteinu, až do hodnoty 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Phr2p se její transglykozylační aktivita neprojevuje. Následně však aktivita proteinu Phr2 v reakční směsi prudce stoupá se stoupající koncentrací Phr2p.



Obrázek 23: Závislost aktivity Phr2p s L6-SR na koncentraci Phr2 proteinu po 3 hod inkubace, inkubace při teplotě 30 °C, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L6-SR, 0–100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

4.3.7 Teplotní stabilita Phr2p

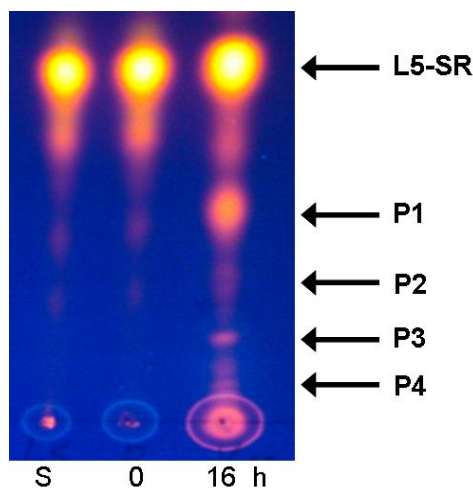
Při teplotě 95 °C byla provedena tepelná inaktivace Phr2p v čase 0, 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min. Z výsledku vyplývá, že už krátkodobé vystavení (5 min) Phr2p teplotě 95 °C snižuje jeho aktivitu o 15 %. K 50 % poklesu transglykozylační aktivity Phr2p došlo přibližně po 15 min teplotní inaktivace při teplotě 95 °C (obrázek 24). Podle tohoto výsledku můžeme říci, že Phr2p je teplotně nestabilní.



Obrázek 24: Procentuální pokles aktivity Phr2p v závislosti na čase inaktivace, inkubace při teplotě 95 °C, odběry v čase 0–60 min, reakční směs: 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 6-SR, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p, 1% laminarin, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrátový pufr pH 3, vzorky naneseny v 5ti paralelních nanáškách (5x5 μl)

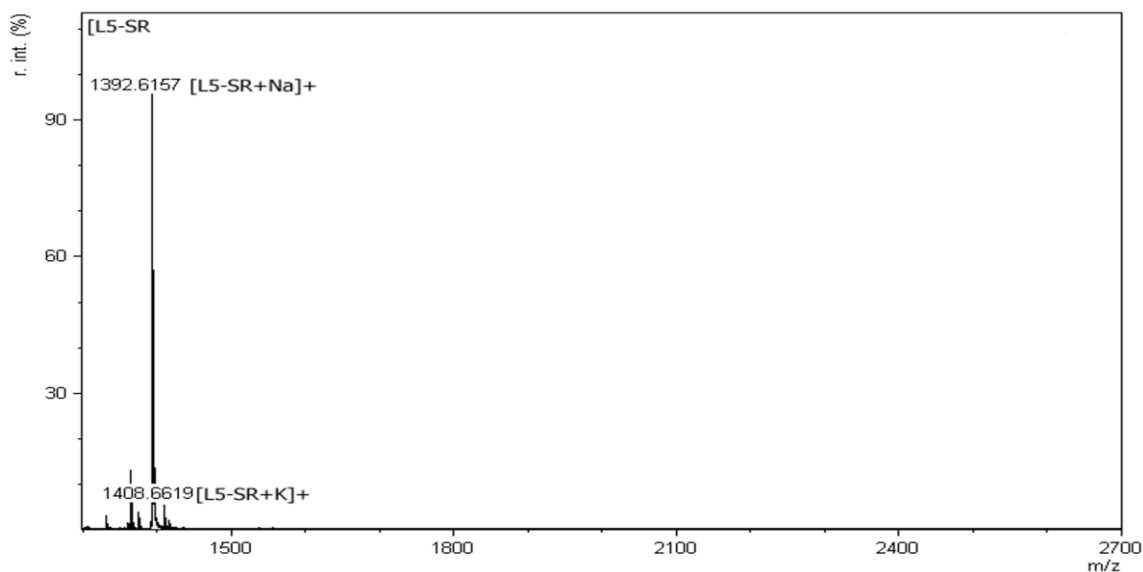
4.3.8 Analýza produktů vzniklých transglykozylační aktivitou Phr2p

Získané produkty transglykozylační reakce katalyzované Phr2p s laminarinem jako donorem a L5-SR jako akceptorem, které obsahují fluorescenční značku, byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. Po transglykozylační reakci byly produkty separovány na TLC destičce, kde v jednotlivých zónách (P1)–(P4) lze identifikovat produkty transglykozylační reakce (obrázek 25).



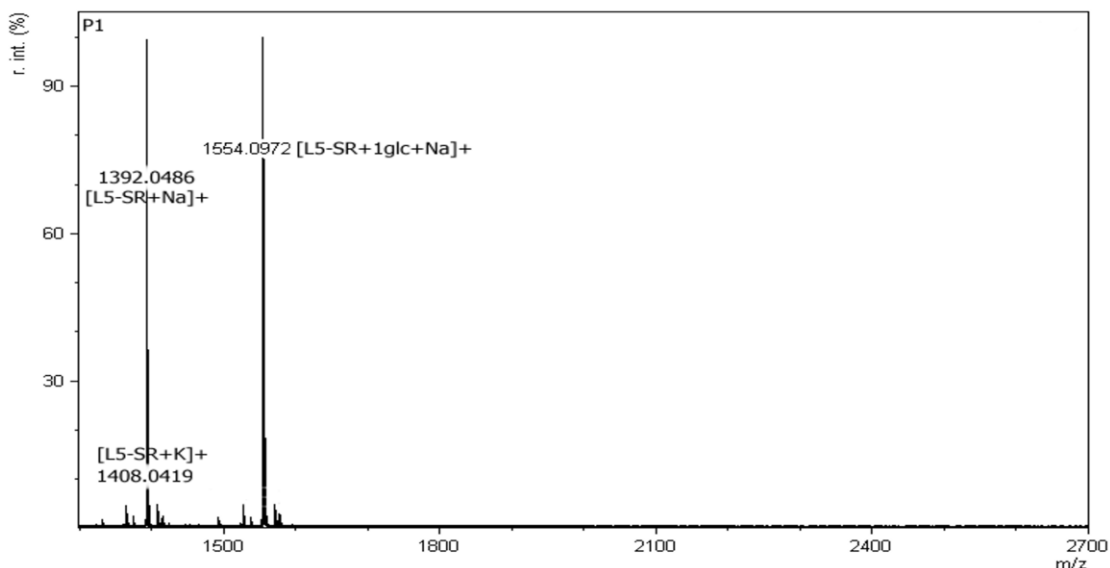
Obrázek 25: TLC destička po vyvíjení v systému n-butanol-ethanol-voda (5 : 3 : 2) s naneseným L5-SR a detekovaným pod UV světlem

Následně pomocí MALDI-TOF analýzy bylo zjištěno, že tyto produkty (P1–P4) byly tvořeny molekulou akceptoru značeného SR, L5-SR, a částmi molekuly donoru, laminarinu, s různým počtem glukózových jednotek (tabulka 3). Zóna L5-SR na chromatogramu odpovídá samostatnému OS L5-SR(Na^+) s molární hmotností $1\,392,615\,7\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (obrázek 26).



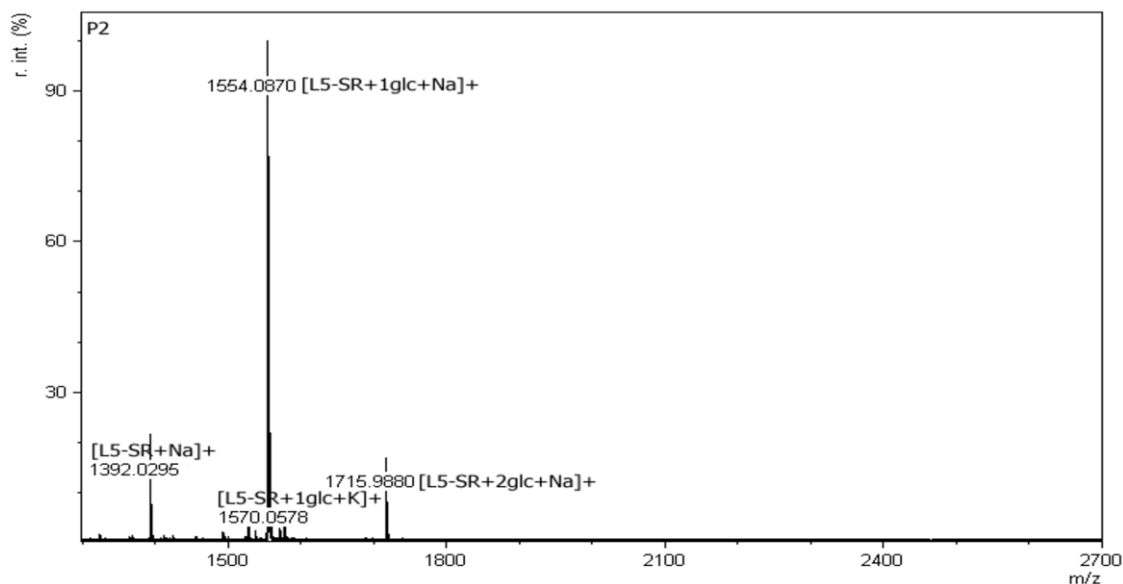
Obrázek 26: Chromatogram L5-SR analyzovaného pomocí MALDI-TOF

V oblasti P1 (obrázek 27) je produkt obsahující akceptor L5-SR a k němu připojená jedna glukózová jednotka ($\text{L5-SR} + 1 \text{ glc} + \text{Na}^+$) s molární hmotností $1\,554,097\,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



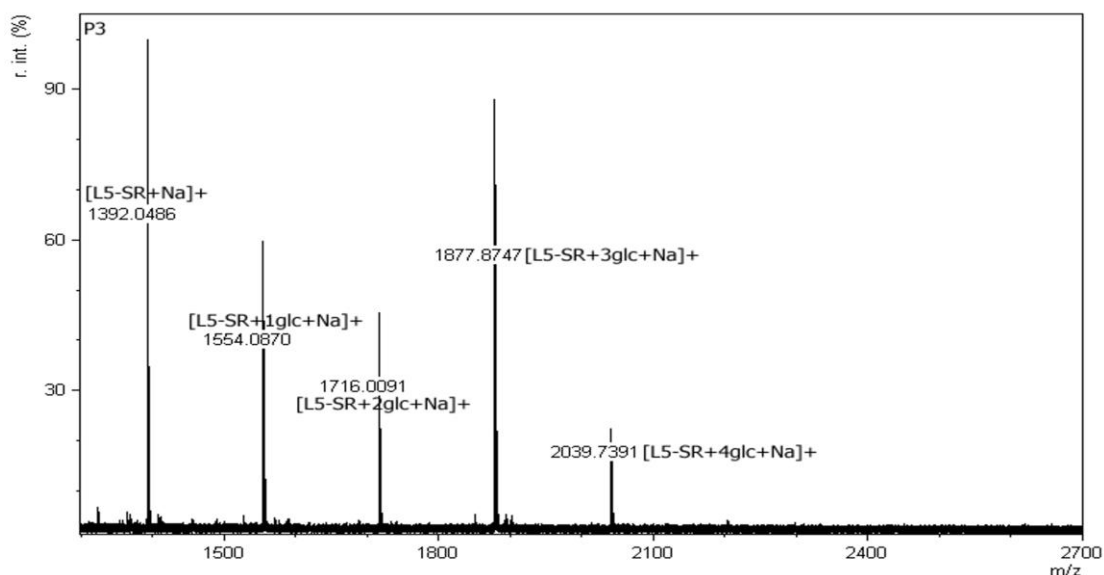
Obrázek 27: MALDI-TOF analýza transglykozylačního produktu P1 reakce L5-SR s laminarinem katalyzované Phr2p

Zóna P2 (obrázek 28) obsahuje kromě samotné L5-SR fragment skládající se z L5-SR a jedné nebo dvou jednotek glukózy ($\text{L5-SR} + 1 \text{ glc} + \text{Na}^+$ a $\text{L5-SR} + 2 \text{ glc} + \text{Na}^+$) s molárními hmotnostmi $1\,554,087\,0$ a $1\,715,988\,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



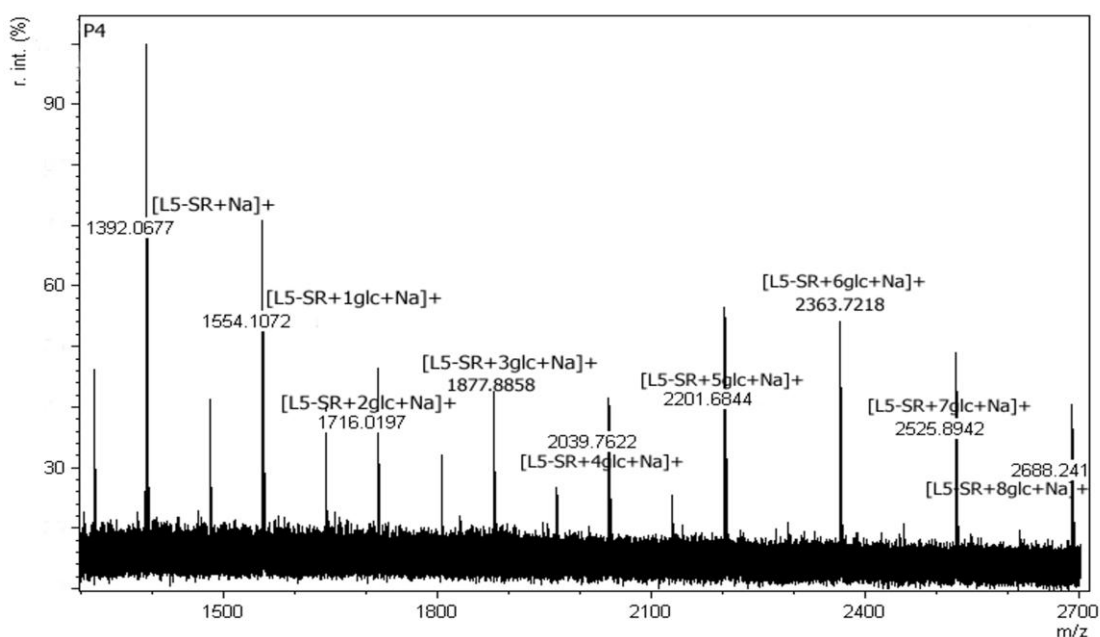
Obrázek 28: MALDI-TOF analýza transglykozylačního produktu P2 reakce L5-SR s laminarinem katalyzované Phr2p

Oblast P3 (obrázek 29) obsahuje produkty složené z L5-SR s navázanou jednou až čtyřmi jednotkami glukózy ($\text{L5-SR} + 1 \text{ až } 4 \text{ glc} + \text{Na}^+$) s molárními hmotnostmi 1 554,087 0; 1 716,009 1; 1 877,874 7 a 2 039,739 1 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$.



Obrázek 29: MALDI-TOF analýza transglykozylačního produktu P3 reakce L5-SR s laminarinem katalyzované Phr2p

V zóně P4 (obrázek 30), nejbližší ke startu, byl L5-SR s jednou až osmi připojenými glukózovými jednotkami ($\text{L5-SR} + 1 \text{ až } 8 \text{ glc} + \text{Na}^+$) s molárními hmotnostmi 1 554,107 2; 1 716,019 7; 1 877,885 8; 2 039,762 2; 2 201,684 4; 2 363,721 8; 2 525,894 2 a 2 688,241 0 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$.



Obrázek 30: MALDI-TOF analýza transglykozylačního produktu P4 reakce L5-SR s laminarinem katalyzované Phr2p

Složení všech produktů P1–P4 je vyjádřeno v následující tabulce 3.

Tabulka 3: Ověření čistoty vybraných sloučenin na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF

Sloučenina	Zóna	Složení detekovaných látek	Teoretický m/z	Experimentální m/z
L5-SR (akceptor)	L5-SR	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1392,435 0	1392,615 7
L5-SR (akceptor)	L5-SR	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{K}]^+$	1408,408 9	1408,661 9
L5-SR	P1	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1392,435 0	1392,048 6
L5-SR	P1	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{K}]^+$	1408,408 9	1408,041 9
P1-1glc	P1	$[\text{C}_{63}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1554,487 8	1554,097 2
L5-SR	P2	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1392,435 0	1392,029 5
P1-1glc	P2	$[\text{C}_{63}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1554,487 8	1554,087 0
P1-1glc	P2	$[\text{C}_{63}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2 + \text{K}]^+$	1570,461 7	1570,057 8
P2-2 glc	P2	$[\text{C}_{69}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{41}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1716,540 6	1715,988 0
L5-SR	P3	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1392,435 0	1392,048 6
P1-1glc	P3	$[\text{C}_{63}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1554,487 8	1554,087 0
P2-2 glc	P3	$[\text{C}_{69}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{41}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1716,540 6	1716,009 1
P3-3 glc	P3	$[\text{C}_{75}\text{H}_{113}\text{N}_3\text{O}_{46}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1878,593 4	1877,874 7
P4-4 glc	P3	$[\text{C}_{81}\text{H}_{123}\text{N}_3\text{O}_{51}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	2040,646 3	2039,739 1
L5-SR	P4	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1392,435 0	1392,067 7
P1-1glc	P4	$[\text{C}_{63}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1554,487 8	1554,107 2
P2-2 glc	P4	$[\text{C}_{69}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{41}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1716,540 6	1716,019 7
P3-3 glc	P4	$[\text{C}_{75}\text{H}_{113}\text{N}_3\text{O}_{46}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1878,593 4	1877,885 8
P4-4 glc	P4	$[\text{C}_{81}\text{H}_{123}\text{N}_3\text{O}_{51}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	2040,646 3	2039,762 2
P5-5glc	P4	$[\text{C}_{87}\text{H}_{133}\text{N}_3\text{O}_{56}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	2202,699 1	2201,684 4
P6-6glc	P4	$[\text{C}_{93}\text{H}_{143}\text{N}_3\text{O}_{61}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	2364,751 9	2363,721 8
P7-7glc	P4	$[\text{C}_{99}\text{H}_{153}\text{N}_3\text{O}_{66}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	2526,804 7	2525,894 2
P8-8glc	P4	$[\text{C}_{105}\text{H}_{163}\text{N}_3\text{O}_{71}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	2688,857 6	2688,241 0

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla biochemická charakterizace Phr2 proteinu vyizolovaného z kvasinky *Candida albicans* a určení transglykozylační aktivity tohoto enzymu. Po úspěšné expresi a purifikaci Phr2p byla transglykozylační aktivita Phr2p měřena fluorescenčními metodami za využití fluorescenčně značených OS, které jsme úspěšně označili SR. Čistota značených OS-SR, L2 až L7-SR, byla zkontrolována pomocí TLC a následně hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Obě metody potvrdily čistotu vzorků.

Při testování transglykozylační aktivity Phr2 proteinu bylo určeno pH optimum Phr2p, které je 3, avšak tento protein vykazuje transglykozylační aktivitu v širším rozsahu pH 2,5–4,5. Dále bylo testováno teplotní optimum Phr2p. Phr2p vykazuje transglykozylační aktivitu při teplotách 25–35 °C, nicméně rychlost transglykozylace je nejvyšší při 30 °C.

Podle papírové fluorescenční metody a HPLC můžeme říci, že nejvhodnějšími akceptory pro transglykozylační reakci jsou β -1,3- vázané laminari-OS. Nebyla pozorována žádná heterotransglykozylační aktivita u akceptorů vázaných β -1,4- a β -1,6- vazbou. Z testu na donorovou specifitu vyplývá, že nejvhodnějším a jediným donorem pro transglykozylační reakci katalyzovanou Phr2p je β -1,3-vázaný laminarin. Byla provedena analýza aktivity Phr2p v závislosti na délce řetězce akceptoru, kde bylo zjištěno, že OS-SR musí obsahovat minimálně 5 glukózových jednotek vázaných β -1,3-vazbou, aby mohl sloužit jako akceptor při transglykozylačních reakcích. Aktivita Phr2 proteinu také závisí na koncentraci samotného Phr2p. Do hodnoty 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Phr2p není jeho transglykozylační aktivita pozorována, se zvyšováním koncentrace Phr2p však aktivita proteinu stoupá. Během testování teplotní stability Phr2p bylo zjištěno, že Phr2 protein je teplotně nestabilní.

Získané produkty transglykozylační reakce byly separovány na TLC destičce a následně byly detekovány pomocí MALDI-TOF analýzy. Při MALDI-TOF analýze bylo zjištěno, že produkty byly tvořeny molekulou akceptoru značeného SR, L5-SR, a částmi molekuly donoru, laminarinu, o různém počtu glukózových jednotek (1 až 8).

Získané výsledky ukazují, že Phr2p je skutečně schopný jen homotransglykozylačního přenosu β -1,3-glukanu na 1,3-glukan *in vitro* a bude zajímavé zjistit a potvrdit tuto aktivitu i *in vivo*. Na kolik i experimenty Ragniho a spol. 0 na úrovni genů ukázaly, že Phr2p produkovaný *PHR2* genem je nevyhnutelný pro správné zesíťování 1,3-glukanu v buněčné stěně *C. albicans*. A také jak je Phr2 protein nezbytný pro její virulenci a schopnost infikovat hostitele, tedy pro hostitel-patogenní interakce. Z tohoto hlediska považujeme Phr2p za zajímavý terč nových antifungálních látek.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- [2] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIČ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 108 s. ISBN 80-718-4990-1.
- [3] MOLERO, G., R. OREJAS, F. GARCÍA, L. MONTEOLIVA a J. PLA. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International microbial*. 1998, Vol 1, No 2, s. 95–106. Dostupné z:
<http://revistes.iec.cat/revistes224/index.php/IM/article/view/4c3da6ffa6b5e.002>
- [4] HAN, Ting-Li, Richard D. CANNON a Silas G. VILLAS-BÔAS. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*. 2011, vol. 48, issue 8, s. 747–763. DOI: 10.1016/j.fgb.2011.04.002.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184511000818>
- [5] BERMAN, Judith a Peter E. SUDBERY. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*. 2002, vol. 3, issue 12, s. 918–932. DOI: 10.1038/nrg948.
Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg948>
- [6] BENNETT, R. J. a A. D. JOHNSON. Mating in *Candida albicans* and the search for sexual cycle. *Annual Review of Microbiology*. 2005, vol. 59, issue 1, s. 233–255. DOI: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121310. Dostupné z:
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.59.030804.121310>
- [7] KIGHTLEY, R.: *Visualphotos. Budding yeast (Candida albicans), computer artwork* [online]. [cit. 2013-09-11]. Dostupné z:
http://www.visualphotos.com/image/1x6041265/budding_yeast_candida_albicans_computer_artwork
- [8] MAZÁŇ, Marián, Katarína MAZÁŇOVÁ a Vladimír FARKAŠ. Bunková stena húb výzva pre výskum nových antimykotík. *Bunková stena húb pre výskum nových antimykotík..* 2006, Volume 100, Issue 6, s. 433–439.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_06_433-439.pdf
- [9] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998, ix, 350 p. ISBN 0-471-96446-8.

- [10] LESAGE, G. a H. BUSSEY. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006-06-07, vol. 70, issue 2, s. 317–343. DOI: 10.1128/MMBR.00038-05.
Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00038-05>
- [11] LIPKE, Peter N. a Raphael OVALLE. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Minireviews*. August 1998, Vol. 180, No. 15, s. 3735–3740.
Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/180/15/3735.full>
- [12] FARKAŠ, Vladimír, Fairouz AIT-MOHAND a Eva STRATILOVÁ. Sensitive detection of transglycosylating activity of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) after isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005, vol. 43, issue 5, s. 431–435. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.03.006.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942805000847>
- [13] KOLLAR, R. Architecture of the Yeast Cell Wall. β -(1 \rightarrow 6)-glucan interconnects manniprotein, β -(1 \rightarrow 3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, vol. 272, issue 28, s. 17762–17775. DOI: 10.1074/jbc.272.28.17762.
Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.28.17762>
- [14] WU, Chaoxi, Bin CHU, Longzhao KUANG, Beibei MENG, Xiaoying WANG, Shunqing TANG. Synthesis of β -1,3-glucan esters showing nanosphere formation. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 98, issue 1, s. 807–812. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.056.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713006528>
- [15] ABE, M. Yeast 1,3-beta-Glucan Synthase Activity Is Inhibited by Phytosphingosine Localized to the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, vol. 276, issue 29, s. 26923–26930. DOI: 10.1074/jbc.M102179200.
Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M102179200>
- [16] DIJKGRAAF, Gerrit J. P., Mitsuhiro ABE, Yoshikazu OHYA a Howard BUSSEY. Mutations in Fks1p affect the cell wall content of β -1,3- and β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*: *Yeast*. 2002, vol. 19, issue 8, s. 671–690. DOI: 10.1002/yea.866. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.866>
- [17] ZEITLINGER, Julia, Itamar SIMON, Christopher T. HARBISON, Nancy M. HANNETT, Thomas L. VOLKERT, Gerald R. FINK a Richard A. YOUNG. Program-Specific Distribution of a Transcription Factor Dependent on Partner Transcription Factor and MAPK Signaling. *Cell*. 2003, vol. 13, issue 3, s. 395–404. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00301-5.
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867403003015#>

- [18] ARAVIND, L., H. WATANABE, D. J. LIPMAN a E. V. KOONIN. Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000-10-10, vol. 97, issue 21, s. 11319–11324. DOI: 10.1073/pnas.200346997.
- [19] HERRERO, A. B., P. MAGNELLI, M. K. MANSOUR, S. M. LEVITZ, H. BUSSEY a C. ABEIJON. KRE5 Gene Null Mutant Strains of *Candida albicans* Are Avirulent and Have Altered Cell Wall Composition and Hypha Formation Properties. *Eukaryotic Cell*. 2004-12-08, vol. 3, issue 6, s. 1423–1432. DOI: 10.1128/EC.3.6.1423-1432.2004. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.3.6.1423-1432.2004>
- [20] CID, V. J. a A. DURAN. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Rev.* 1995, vol. 59, no. 3, s. 345–386. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/content/59/3/345.abstract>
- [21] CABIB, Enrico, Noelia BLANCO, Cecilia GRAU, José Manuel RODRÍGUEZ-PEÑA a Javier ARROYO. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to β -(1,6)-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Microbiology*. 2007, vol. 63, issue 3, s. 921–935. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05565.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05565.x>
- [22] KLEBL, F. a W. TANNER. Molecular Cloning of a Cell Wall Exo- β -1,3-Glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1989, vol. 171, no. 17, s. 6259–6264. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/171/11/6259.full.pdf+html>
- [23] ORLEAN, P. a H. AMMER. Synthesis of an O-glycosylated cell surface protein induced in yeast by α factor. *Acad Sci U S A*. 1986, vol. 83, no. 17, s. 6263–6266. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/83/17/6263.short>
- [24] MOUKADIRI, I., L. JAAFAR a J. ZUECO. Identification of Two Mannoproteins Released from Cell Walls of a *Saccharomyces cerevisiae* mnn1 mnn9 Double Mutant by Reducing Agents. *J. Bacteriol.* 1999, vol. 181, no. 16, s. 4741–4745. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/181/16/4741.short>
- [25] KAPTEYN, J. C., P. VAN EGMOND, E. SIEVI, H. VAN DEN ENDE, M. MAKAROW a F. M. KLIS. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β -1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Microbiology*. 1999, vol. 31, issue 6, s. 1835–1844. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01320.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01320.x>

- [26] JAAFAR, Lahcen, Ismaïl MOUKADIRI a Jesús ZUECO. Characterization of a disulphide-bound Pir-cell wall protein (Pir-CWP) of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 2003-04-15, vol. 20, issue 5, s. 417–426. DOI: 10.1002/yea.973.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.973>
- [27] KAPTEYN, Johan C., Roy C. MONTIJIN, Edwin VINK, Jesús DE LA CRUZ, Antonio LLOBELL, Jeroen E. DOUWES, Hitoshi SHIMOI, Peter N. LIPKE a Frans M. KLIS. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology*. 1996, vol. 6, issue 3, s. 337–345. DOI: 10.1093/glycob/6.3.337.
Dostupné z: <http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/glycob/6.3.337>
- [28] MAZÁŇ, Marian, Noelia BLANCO, Kristína KOVÁČOVÁ, Zuzana FIRÁKOVÁ, Pavel ŘEHULKA, Vladimír FARKAŠ a Javier ARROYO. A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical Journal*. 2013-11-1, vol. 455, issue 3, s. 307–318. DOI: 10.1042/BJ20130354.
Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/455/bj4550307.htm>
- [29] FARKAS, Vladimír, Zdena SULOVA, STRATILOVA, Rami HANNA a Gordon MACLACHLAN. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992, vol. 298, issue 2, s. 365–370. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90423-T.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000398619290423T>
- [30] FRY, S.C., Rachel C. SMITH, Kristie F. RENWICK, David J. MARTIN, Sarah K. HODHE, Kathryn J. MATTHEWS, Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J*, roč. 282, 1992, č. 3, s. 821–828.
- [31] NISHITANI, K., R. TOMINAGA, Endo-xyloglucan Transferase, a Novel Class of Glycosyltransferase That Catalyzes Transfer of a Segment of Xyloglucan Molecule to Another Xyloglucan Molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, roč. 267, 1992, č. 29, s. 21058–21064.
- [32] AIT-MOHAND, F., Vladimír FARKAŠ, Screening for hetero-transglycosylating activities in extracts from nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Carbohydrate Research*, roč. 341, 2006, č. 5, s. 577–581.
- [33] ZEMKOVÁ, Z.: Prezentace obhajoby písemné práce k dizertační zkoušce, 2012.

- [34] MOUYNA, I. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glucanosyltransferases Play an Active Role in the Biosynthesis of the Fungal Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, vol. 275, issue 20, s. 14882–14889. DOI: 10.1074/jbc.275.20.14882. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.20.14882>
- RAGNI, E., A. COLUCCIO, E. ROLLI, J. M. RODRIGUEZ-PENA, G. COLASANTE, J. ARROYO, A. M. NEIMAN a L. POPOLO. GAS2 and GAS4, a Pair of Developmentally Regulated Genes Required for Spore Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 2007-02-08, vol. 6, issue 2, s. 302–316. DOI: 10.1128/EC.00321-06. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00321-06>
- [35] MAZÁŇ, Marián, Enrico RAGNI, Laura POPOLO a Vladimír FARKAŠ. Catalytic properties of the Gas family β -(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochemical Journal*. 2011-09-1, vol. 438, issue 2, s. 275–282. DOI: 10.1042/BJ20110405. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/438/bj4380275.htm>
- [36] RAGNI, Enrico, Julia CALDERON, Umberto FASCIO, Matthias SIPICZKI, William A. FONZI a Laura POPOLO. Phr1p, a glycosylphosphatidylinositol-anchored β -(1,3)-glucanosyltransferase critical for hyphal wall formation, localizes to the apical growth sites and septa in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 2011, vol. 48, issue 8, s. 793–805. DOI: 10.1016/j.fgb.2011.05.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184511000922>
- [37] CABIB, E., Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1 and Crh2 attach chitin to both β -(1-6)- and β -(1-3)-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryotic cell*, roč. 8, 2009, č. 11, s. 1626–1636.
- [38] TEPARIĆ, R. a Vladimir MRŠA. Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Current Genetics*. 2013, vol. 59, issue 4, s. 171–185. DOI: 10.1007/s00294-013-0403-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-013-0403-0>
- [39] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [40] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [41] PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1986.

- [42] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
- [43] HPLC - High Performance Liquid Chromatography: What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?. *Waters: The science of what's possible* [online]. [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US
- [44] KRÁLOVÁ, Blanka, Pavel RAUCH, Ladislav FUKAL a Tomáš RUML. *Bioanalytické metody*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995, 280 s. ISBN 80-708-0234-0.
- [45] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [46] Laboratorní metody. BAČINA, Aleš, Eva BUDAYOVÁ a Eva VOKATÁ. *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové* [online]. [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>
- [47] High Performance (Pressure) Liquid Chromatography (HPLC). *Boomer* [online]. [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.boomer.org/c/p3/c03/c0305.html>
- [48] School of chemistry and biochemistry Georgia institute of technology: SDS Page Gel Electrophoresis. *Georgia chemistry and tech biochemistry* [online]. 1/05/2001 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html
- [49] *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. 2., upr. a dopl. vyd. Editor Václav Helán. Český Těšín: 2 THETA, 2005, 502 s. ISBN 80-863-8029-7.
- [50] HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír*. 1999, roč. 78, č. 8, s. 448. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>
- [51] PREISLER, Jan. Jan Preisler. PULEC, Jiří a Jiřina KALEDOVSKÁ. *Masarykova univerzita: založení, stavební vývoj, insignie* [online]. Vyd. 1. V Brně: Masarykova univerzita, 1994, Jul 11, 2012 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://bart.chemi.muni.cz>
- [52] Laboratoř z analytické chemie II (LACHII): Fluorimetrie. FÄHNRIICH, Jan. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Ústav analytické chemie VŠCHT Praha* [online]. 02/14/2014 [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/>

- [53] FRY, Stephen C. Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *The Plant Journal*. 1997, vol. 11, issue 5, s. 1141–1150. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x>
- [54] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Δ	mutant s příslušným nefunkčním genem
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ATP	adenosintrifosfát
β -1,3-GS	β -1,3-glukan syntáza
β -1,6-GS	β -1,6-glukan syntáza
Bgl2p	transglukozidáza
<i>BIG1</i>	gen kódující protein Big1a
C5-SR	β -1,4-celopentaóza značená sulforodaminem
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBB R250	Coomassie Brilliant Blue R-250
CM-celulóza	karboxymethyl-celulóza
CM-glukan	β -1,4-karboxymethyl-glukan
CM-chitin	karboxymethyl-chitin
Co ²⁺	kobaltnatý kation
Crh	chitin transferáza
Crh1p	chitin transferáza
Crh2p	chitin transferáza
Crr1p	homolog Crh1 a Crh2 aktivní během sporulace
<i>crh1</i>	mutant genu Crh1
<i>crh2</i>	mutant genu Crh2
<i>crr1</i>	mutant genu Crr1
CS	chitin syntáza
CSI	chitin syntáza I
CSII	chitin syntáza II
CSIII	chitin syntáza III
<i>csIII</i>	mutant genu pro chitin syntázu III
HE-celulóza	hydroxyethyl-celulóza
<i>FKS</i>	gen kódující katalytickou podjednotku β -1,3-glukan syntázy
<i>FKS1</i>	gen kódující katalytickou podjednotku β -1,3-glukan syntázy
<i>GSC2</i>	gen kódující katalytickou podjednotku β -1,3-glukan syntázy
<i>FKS3</i>	gen kódující katalytickou podjednotku β -1,3-glukan syntázy
<i>Fks3</i>	protein kódovaný genem <i>FKS3</i>
Gas	glukan transferáza
<i>GAS</i>	gen kódující protein Gas
<i>GAS1</i>	gen kódující glukan transferázu 5
Gas1p	glukan transferáza 1
Gas2p	glukan transferáza 2
Gas3p	glukan transferáza 3
Gas4p	glukan transferáza 4
Gas5p	glukan transferáza 5
Gel	glukan transferáza <i>A. fumigatus</i>

GH	glykozylové hydrolázy
GH 16	rodina glykozylových hydroláz 16
GH 72	rodina glykozylových hydroláz 72
glc	glukózová jednotka
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
GPI	glykosyl fosfatidyl inositol
GS	glukan syntáza
Gsc2p	protein kódovaný genem <i>GSC2</i>
H ⁺	vodíkový kation
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CH5-SR	β-1,4-chitopentaóza značená sulforodaminem
CHSFF	chelatační sepharóza fast flow
<i>KNH1</i>	gen kódující <i>O</i> -glykoprotein buněčné stěny
<i>KRE1</i>	gen kódující serin a threonin
<i>KRE5</i>	gen kódující velký rozpustný protein endoplazmatického retikula
<i>KRE6</i>	gen kódující protein Golgiho aparátu
<i>KRE9</i>	gen kódující <i>O</i> -glykoprotein buněčné stěny
L2	laminaribióza
L2-SR	laminaribióza značená sulforodaminem
L3	laminaritrióza
L3-SR	laminaritrióza značená sulforodaminem
L4	laminaritetraóza
L4-SR	laminaritetraóza značená sulforodaminem
L5	laminaripentaóza
L5-SR	laminaripentaóza značená sulforodaminem
L6	laminarihexaóza
L6-SR	laminarihexaóza značená sulforodaminem
L7	laminariheptaóza
L7-SR	laminariheptaóza značená sulforodaminem
M5-SR	α-1,4-maltopentaóza značená sulforodaminem
MALDI	desorpce a ionizace laserem za účasti matrice
Mano-4-SR	β-1,4-manotetraóza značená sulforodaminem
Mg ²⁺	hořečnatý kation
MGY médium	glycerol-komplexní médium
MLG-SR	smíšený β-1,3/1,4-glukan značený sulforodaminem
MMY médium	methanol-komplexní médium
MS	hmotnostní spektrometrie
Na ⁺	sodný kation
Ni ²⁺	nikelnatý kation
OS	oligosacharid
OS-SR	oligosacharid značený sulforodaminem
P6-SR	β-1,6-pustulohexaóza značená sulforodaminem
<i>PGA4</i>	gen kódující homolog <i>Phr1</i> a <i>Phr2</i> <i>C. albicans</i>

<i>PGA5</i>	gen kódující homolog Phr1 a Phr2 <i>C. albicans</i>
Phr	protein reagující na pH
<i>PHR</i>	gen reagující na pH
Phr1p	protein 1 reagující na pH
<i>PHR1</i>	gen 1 reagující na pH
<i>phr1</i>	mutant genu Phr1
Phr2p	protein 2 reagující na pH
<i>PHR2</i>	gen 2 reagující na pH
<i>PHR3</i>	gen kódující homology Phr1p a Phr2p <i>C. albicans</i>
Pir protein	kovalentně vázané proteiny v buněčné stěně <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
R_F	retenční faktor
Rho1p	malý signální G protein
Rim101p	hlavní transkripční faktor
<i>ROT1</i>	gen kódující protein Rot1p
SAV	Slovenská akademie věd
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
<i>SKN1</i>	gen kódující protein Golgiho aparátu
SR	sulforodamin
TEMED	N, N, N',N'-tetramethylethylendiamin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TOF	průletový analyzátor
UDP-glukóza	uridin difosfát-glukóza
UDP-GlcNAc	uridin difosfát-N-acetylglukózamin
UV	ultrafialové záření
X6-SR	1,4-β-D-xylohexaóza značená sulforodaminem
XET	xyloglukan endotransglykozyláza
XET/XTH	xyloglukan endotransglykozyláza/hydroláza
XGO7-SR	xyloglukanheptaóza značená sulforodaminem